JARC

علمی-پژوهشی

تهیه و شناسایی نانوذرات نقره عامل‌دارشده با ٤-بنزن‌سولفونامیدتیوفنل و بررسی پیوند آن با دی‌اکسی‌ریبونوکلوئیک اسید (DNA) و سرم آلبومین انسانی (HSA) و سرم آلبومین گاوی (BSA) به روش‌های متفاوت طیف‌نورسنجی

فرشته امیری[۱]، مرضیه صادقی[۲و*] و طاهره شکری[۲]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور، مرکز خوی، ایران

۲. استادیار شیمی تجزیه ، دانشکده شیمی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

دریافت: اسفند ۹۸ بازنگری: مهر ۹۹ پذیرش: مهر ۹۹

چکیده: نانوذه‌های نقره عامل‌دارشده با ۴-بنزن‌سولفونامیدتیوفنل (BSATP-AgNPs) تهیه و تشکیل نانوذرات BSATP-AgNPs با روش‌های طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، طیف‌های رزونانس مغناطیسی (^{1}H NMR)، میکروسکوپی عبوری الکترونی (TEM) و طیف‌نورسنجی UV-Vis شناسایی شد. برهم‌کنش نانوذرات با دی‌اکسی‌ریبونوکلوئیک اسید (DNA) و سرم آلبومین انسانی (HSA) و سرم آلبومین (BSA) گاوی با روش‌های طیف‌نورسنجی UV-Vis، طیف‌سنجی فلورسانس، طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی (CD)، اندازه‌گیری گران‌روی و داکینگ مولکولی بررسی شد. داده‌های طیفی دورنگ‌نمایی دورانی نشان داد که پیوند نانوذرات با DNA منجر به تغییر در ساختار DNA می‌شود که نشان‌دهنده حالت پیوند شیار جزیی است. در فلورسانس نانوذره‌های BSATP-AgNPs در حضور مقادیر متفاوت DNA کاهش شدت مشاهده شد. عامل‌های ترمودینامیکی نشان داد که پیوند یونی نقش اصلی را در پیوند نانوذرات به DNA دارند. مطالعه‌های داکینگ مولکولی نیز حاکی از وجود شیار جزئی پیوند است. با توجه به نتایج و داده‌های آزمایشی، برهم‌کنش قابل‌توجهی بین نانوذرات BSATP-AgNPs با HSA و BSA مشاهده شد. نتایج داده‌های CD نشان داد که صورتبندی مولکول‌های HSA و BSA به‌طور قابل‌توجهی در حضور نانوذرات BSATP-AgNPs تغییر می‌کند. مقادیر ΔH^0 منفی و ΔS^0 مثبت نشان داد که برهم‌کنش عمده بین نانوذرات و HSA پیوندهای هیدروژنی و نیروهای ضعیف واندروالس است. افزون‌براین، با توجه به داده‌های ترمودینامیکی (آنتالپی منفی و تغییرات آنتروپی مثبت)، آب‌گریزی نقش پایه‌ای در پیوند نانوذرات به BSA ایفا کرده است. نتایج آزمایش‌های رقابتی نشان‌دهنده‌های جایگاه پیوند تایید کرد که نانوذرات BSATP-AgNPs به سرم آلبومین انسانی در مکان I زیرگروه IIA و به BSA در مکان II پیوند شده است.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات نقره عامل‌دارشده با BSATP، DNA ، سرم آلبومین انسانی، سرم آلبومین گاوی، مطالعات اسپکتروسکوپی، داکینگ مولکولی

* **عهده‌دار مکاتبات:** m.sadeghi@razi.ac.ir

مقدمه

برهم‌کنش مولکول‌های کوچک با DNA (دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید) در سال‌های اخیر موردتوجه بسیار زیادی قرار گرفته است، چرا که این برهم‌کنش‌ها می‌تواند پایه بسیاری از فرایندهای داخل سلولی باشد و موجب شود که تغییرات در رونویسی و همانند سازی DNA قابل پیش‌بینی باشد. از این پیش‌بینی‌ها می‌توان در بررسی مرگ سلولی، تکثیر سلولی، جهش‌های ژنی، علل ایجاد سرطان و درمان آن استفاده کرد. ترکیب‌های پیوندشونده به DNA می‌توانند طیف گسترده‌ای از اثرات نهانی پادسرطان، پادویروس یا سرطان‌زایی را داشته باشند. از بررسی انواع برهم‌کنش‌های ترکیب‌ها با DNA می‌توان در طراحی داروهایی با کارایی بیشتر، مطالعه تغییرات ساختار DNA در اثر واکنش با ترکیب‌های متفاوت و حتی در مطالعه ساختارهای پروتئین- نوکلئیک اسید استفاده کرد.

بیشتر داروهای موجود افزون‌بر سلول‌های بافت هدف به سلول‌های سالم بدن نیز آسیب‌های زیادی وارد می‌کنند. این اثرات جانبی موجب محدودیت استفاده از این داروها می‌شود و اثربخشی آن‌ها در مهار بیماری را تا حد زیادی کاهش می‌دهد. امروزه با پیدایش مقاومت‌های دارویی و عوارض جانبی شدید، داروهای شیمی‌درمانی متفاوت سرطان به‌عنوان تهدیدی برای زندگی و عامل مهمی برای مرگ‌ومیر در سراسر جهان تبدیل شده است [۱]. ازاین‌رو، نیاز فوری به توسعه روش‌های درمانی برای تشخیص زودهنگام و درمان سرطان با کمترین عوارض جانبی احساس می‌شود. در این راستا، پژوهش‌های اخیر به توسعه متنوع نانومواد، دستگاه‌ها و عوامل درمانی برای تشخیص زودهنگام و درمان سرطان منجر شده است [۲ و ۳]. امروزه، استفاده از داروهای شیمی‌درمانی موجود مانند دوکسوروبیسین، دانوروبیسین، بلئومایسین، و سیس پلاتین با ویژگی‌های ضعیف، هزینه بالا، سمیت بالا، عوارض جانبی و پیدایش مقاومت دارویی محدود شده است. با وجود پیشرفت تشخیص زودرس و درمان، کشف درمان‌های جایگزین، ابزار و دارو برای وضعیت مطلوب ضروری است. توسعه نانوذرات دارویی برای تحویل دارو به‌شدت موردمطالعه قرارگرفته است که شامل تولید، پایداری، فرمولاسیون و دارورسانی است [۳ و ۴].-در میان نانومواد متنوع، نانوذرات نقره به دلیل ویژگی‌های بی‌همتا مانند رسانایی، کاتالیستی، پادباکتریایی، زیست‌سازگاربودن با شرایط محیط بدن و تهیه آسان موردتوجه پژوهشگران قرارگرفته است. نقره و فراورده‌های نقره با توجه به فعالیت پادمیکروبی برای طیف گسترده‌ای از ریزاندامگان[1]ها مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، تک‌یاخته‌ها و به تازگی ویروس‌ها به‌کارگرفته شده‌اند [۵].

امروزه نانوذرات فلزهای نجیب و از آن میان نانوذرات نقره در زمینه‌های دارویی و پادسرطانی موردتوجه قرار گرفته‌اند [۶ تا ۱۰]. گروه‌های بنزن‌سولفونامیدها، گستره وسیعی از ویژگی‌های زیستی و دارویی را دارند. این داروها در درمان بسیاری از بیماری های عفونی و انگلی (مانند مالاریا) کاربرد دارند و سازوکار اثر آن ها مهار سنتز اسیدنوکلئیک است. سولفونامیدها با مهار رقابتی آنزیم دی‌هیدروپتروآت سنتتاز (DHPS[2]) موجب توقف رشد سلول می‌شوند [۱۱ و ۱۲]. در این پژوهش تلاش شد با قراردادن این گروه بر نانوذره‌های نقره و با توجه به ویژگی ذکرشده این نانوذره‌ها، ترکیبی با ویژگی پادتوموری ساخته شود.

برهم‌کنش نانوذره‌های نقره با بازهای DNA با روش‌های طیف‌سنجی رزونانس پلاسمون سطحی (SPRS[3]) و پراکندگی ارتقاءیافته سطحی رامان (SERS) توسط باسو و همکارانش بررسی شد [۹]. در پژوهش آن‌ها تجمع نانوذره‌ها در اثر برهم‌کنش با بازهای آدنین، گوانین و سیتوزین موجب

1. Microorganism
2. Dihydropteroate synthase (DHPS)
3. Surface plasmon resonance spectroscopy (SPRS)

تجمع نانوذره‌ها و تغییر در طیف آن‌ها شد. در مطالعه دیگری برهم‌کنش نانوذره نقره در حضور ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم برمید (NanoAg–CTMAB) و کاربردهای تجزیه‌ای آن موردبررسی قرارگرفت [۱۰]. در کار آن‌ها از نانوذره‌های نقره با ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم برمید به عنوان پروب برای اندازه‌گیری غلظت نوکلئیک اسیدها در DNA اسپرم ماهی (fsDNA)، تیموس گوساله (ct-DNA) و مخمر (yRNA) در مقادیر کمتر از نانوگرم بر لیتر استفاده شد. این مطالعه نشان داد که کمپلکس NanoAg–CTMAB قادر به ایجاد تغییرهای ساختاری و همچنین، تغییر در مقدار پیچش DNA است. نقش نانوذرات طلا و نقره به‌عنوان نانودارو در پژوهش‌های سرطان توسط چونگ و همکارانش بررسی شد [۷]. آن‌ها عملکرد نانوذره‌های طلا و نقره در درمان‌های سرطان با داروهای مرسوم در این زمینه را مقایسه و مشخص کردند که نانوداروهای یادشده عوارض نامطلوب جانبی داروهای مرسوم سرطان را ندارند. در این کار انواع روش‌های تهیه، مشخصه‌یابی و سازوکارهای تهیه این نانوذره‌ها بررسی شد.

در این گزارش، تهیه و بررسی ویژگی نانوذره‌ها نقره عامل‌دارشده با ۴–بنزن‌سولفنامیدتیوفنل و همچنین، برهم‌کنش آن‌ها با DNA تیموس گوساله (ct-DNA) و سرم آلبومین انسانی (HSA) و سرم آلبومین گاوی (BSA) با روش‌های متفاوت مانند طیف‌سنجی فرابنفش– مریی، طیف‌سنجی فلورسانس، طیف دورنگ‌نمایی دورانی (CD[1])، اندازه‌گیری گران‌روی و داکینگ مولکولی ابزاری انجام شد. تا به حال برهم‌کنش بین این نوع از نانوذره‌ها BSATP-AgNPs با ct-DNA و سرم آلبومین انسانی (HSA) و سرم آلبومین گاوی (BSA) صورت نگرفته است. نتایج تجربی با نتایج به‌دست آمده از مطالعه داکینگ مولکولی سازگاری داشت. این پژوهش بینش مهمی از برهم‌کنش BSATP-AgNPs با DNA و سرم آلبومین انسانی و گاوی و همچنین، ارایه پژوهش‌های بیشتر در مورد رفتار دارویی BSATP-AgNPs فراهم می‌کند.

مواد و دستگاه‌ها

همه مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان و دزوکسی ریبو نوکلئیک اسید تیموس گوساله (ct -DNA) از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شدند. همه محلول‌ها با آب دو بار تقطیر تهیه شدند. طیف ارتعاشی فروسرخ تبدیل فوریه FTIR از نانوذرات BSATP-AgNPs در ناحیه ۴۰۰ تا $۴۰۰۰cm^{-1}$ با طیف‌سنج بروکر و با قرص پتاسیم برمید گرفته شد. طیف‌های رزونانس مغناطیسی (^1H NMR) با دستگاه NMR مدل بروکر Avance DRX-500 MHz با استاندارد داخلی تترامتیل‌سیلان گرفته شد. ریخت‌شناسی و تعیین اندازه نانوذره‌های نقره در این پژوهش با میکروسکوپ عبوری الکترونی (Philips TEM، XL 30) هلند انجام شد. طیف‌های فرابنفش-مرئی با طیف‌نورسنج فرابنفش-مرئی مدل اجیلنت HP 8453 ثبت شد. طیف‌های فلورسانس با دستگاه جاسکو مدل JASCO FP 6200 و طیف‌های دورنگ‌نمایی دورانی با دستگاه جاسکو مدل JASCO J- 810 گرفته و گران‌روی با گران‌روی‌سنج مدل SCHOT-AVS 450 اندازه‌گیری شد. تنظیم pH با بافر هپس و با pH متر مدل JENWAY 3345 انجام شد.

تهیه نانوذره‌های نقره عامل‌دارشده با ۴–بنزنسولفونامیدتیوفنل (BSATP-AgNPs)

در ابتدا آمینوتیوفنل برپایه روش گزارش‌شده آماده شد [۱۳]. به یک بالن ته‌گرد ۲۵۰ میلی‌لیتری محلول نقره نیترات (۶/۰ میلی‌مول، ۱/۰گرم) در آب (۲۰ میلی‌لیتر) و متانول (۱۰ میلی‌لیتر) افزوده شد. مواد فوق در حمام یخ (۲۷۴ کلوین) قرار گرفت و با همزن مخلوط شد. سپس ۴ –آمینوتیوفنل (۲ میلی‌مول، ۰/۳گرم) حل‌شده در متانول (۱۰ میلی‌لیتر) به‌آرامی به آن افزوده شد و

1. Cirular dichroism (CD)

محلول زرد رنگ شفافی به‌دست آمد. سپس، محلول تازه‌ای از سدیم بورهیدرید ($NaBH_4$) (۳میلی‌مول، ۰/۱گرم) در ۵ میلی‌لیتر آب آماده شد. سدیم بورهیدرید آب‌دوست در مدت بیش از ۵ ثانیه به محلول سرد افزوده و به مخلوط اجازه‌داده شد به‌تدریج (حدود ۱۸ ساعت) به دمای اتاق برسد. به مخلوط به‌دست آمده ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول افزوده و سپس مخلوط در دمای ۲۷۴ کلوین به‌مدت ۲۴ ساعت درون ظرفی ثابت نگه‌داشته شد. پس از این مدت محلول بالای نانوذره‌ها با پیپت خارج و ۲۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به آن افزوده شد. این عمل سه بار تکرار شد تا حلال تعویض شود. عدم حضور ۴-آمینوتیوفنل آزاد در محلول نانوذره‌ها با طیف FTIR تایید شد. مخلوط به‌دست آمده پس از فراصوت‌دهی، در حمام یخ (۲۷۴ کلوین) قرارگرفت و با همزن مخلوط هم‌زده شد. سپس، سدیم هیدروکسید (۲نرمال، ۸/۰ میلی‌لیتر) به آن افزوده شد. پس از ۱۰دقیقه محلول بنزن‌سولفونیل کلرید (۴میلی‌مول، ۳۲۰ میکرولیتر) حل‌شده در دی‌کلرومتان (۵ میلی‌لیتر) با سرنگ به صورت قطره‌های بسیار ریز آهسته به ظرف واکنش افزوده شد. در ظرف به‌طور کامل پوشانده شد و به مخلوط در همان وضعیت، ۲۴ ساعت زمان داده شد تا به تدریج به دمای اتاق برسد. یک مخلوط دو فازی به‌دست آمد و با جدا کردن حلال که فازی شفاف و بی‌رنگ بود مخلوط نانوذره قهوه‌ای رنگ درون آب به خوبی حل شد. طرح واره تهیه نانوذره‌ها BSATP-AgNPs در شکل ۱ نشان داده شده است.

تهیه محلول‌ها

بافر هپس با غلظت ۰/۰۵ مولار در آب دوبار تقطیر تهیه شد و pH آن به کمک محلول سدیم هیدروکسید در ۷/۴ تنظیم شد. از بافر فسفات ۰/۵ مولار برای تهیه محلول موردنیاز آزمایش دورنگ‌نمایی دورانی CD استفاده شد. برای تهیه محلول، ۱ تا ۲میلی‌گرم از ct- DNA در ۲میلی‌لیتر بافر هپس ۰/۰۵مولار حل و به‌مدت ۱۲ساعت در دمای ۲۷۴ کلوین در یخچال نگه‌داری شد. برای اندازه‌گیری غلظت ct-DNAاز روش طیف‌سنجی فرابنفش–مرئی استفاده شد. در این روش جذب محلول ct- DNA درطول موج بیشینه جذب مربوط در ۲۶۰ نانومتر (ε_{DNA}= ۶۶۰۰) اندازه‌گیری و با قانون بیر تعیین غلظت شد. برای اطمینان از خلوص DNA و عدم حضور پروتئین‌ها، جذب محلول در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. نسبت جذب در این دو طول موج ۱/۹ به‌دست آمد. برای تهیه محلول‌های آلبومین انسانی و آلبومین گاوی به غلظت 3×10^{-4} مولار، ۰/۰۴۹۵ گرم از HSA و BSA با ۹۶ ٪ خلوص به‌صورت پودر لیوفیلیزشده با وزن مولکولی ۶۷۰۰۰ دالتون در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیرشده، حل شد. این محلول در دمای ۲۷۴ کلوین در یخچال و به دور از نور نگهداری شد و به‌طور روزانه مورد استفاده قرار می‌گرفت.

اندازه گیری‌های جذب و فلورسانس

در یک سل کوارتز با طول مسیر یک سانتی‌متر غلظت‌های متفاوتی از ct-DNA به محلولی با غلظت 5×10^{-5} مولار از BSATP-AgNPs افزوده شد و در دمای ۲۹۸ کلوین و در ناحیه ۲۰۰ تا۵۰۰ نانومتر طیف‌های جذبی فرابنفش ثبت شد. طیف‌های جذبی محلول های 3×10^{-4} مولار از BSA و HSA در نبود و بودن مقادیر متفاوت نانوذره‌های نقره در یک سل کوارتز با طول مسیر یک سانتی‌متر در دمای ۲۹۸ کلوین و در ناحیه ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر ثبت شد. طول موج بیشینه (λ_{max}) سرم آلبومین ۲۸۰ و نانوذره ۴۱۰ نانومتر بود.

در ثبت طیف‌های فلورسانس نانوذره‌های نقره پهنای شکاف مونوکروماتور برانگیختگی ۵ نانومتر و مونوکروماتور نشر ۱۰ نانومتر انتخاب شد و در درون سل کوارتز با طول مسیر ۱ سانتی‌متر با شدت میانگین آشکارساز ثبت شد. اندازه‌گیری‌های فلورسانس با طیف‌سنج فلورسانس JASCO FP6200 با ثابت نگه‌داشتن غلظت BSATP-AgNPs در گستره غلظت DNA از ۰/۰ تا $4/0 \times 10^{-4}$ مولار انجام شد.

در ثبت طیف‌های فلورسانس سرم آلبومین انسانی و گاوی، پهنای شکاف مونوکروماتور برانگیختگی ۵ نانومتر و تک‌فام‌ساز نشر۱۰ نانومتر انتخاب شد و در درون سل کوارتز با طول مسیر یک سانتی‌متر با شدت میانگین آشکارساز ثبت شد. در این مطالعات، نشر ذاتی HSA در λ_{em} برابر با ۳۴۰ نانومتر و نشر ذاتی BSAدر λ_{em} برابر با ۳۴۳ و طول موج برانگیختگی (λ_{ex}) برابر با ۲۹۰ نانومتر به‌کارفت.

شدت نشر فلوئورسانس محلول M $^{-5}$ ۱۰ ×۳/۰ از HSA و BSA در نبود و بودن مقادیر متفاوت از نانوذره‌های BSATP-AgNPsدر دماهای متفاوت ثبت شد.

در مطالعه نشان‌دهنده جایگاه، پیش و پس از افزودن مقداری از هر کدام از نشان‌دهنده‌های جایگاه (ایبوبروفن و وارفارین)، مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs در دمای ۲۹۸ کلوین افزوده و شدت نشر فلورسانس HSA و BSA ثبت شد. ایبوبروفن و وارفارین در λ_{em} برابر با ۲۹۵ نانومتر، نشر بسیار ضعیفی دارند که تداخلی ایجاد نمی‌کند.

اندازه‌گیری طیف دورنگ‌نمایی دورانی

اثر نانوذره‌های BSATP-AgNPs بر ساختار دوم ct-DNAبا روش طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی مطالعه شد. طیف‌ها در ناحیه ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر ثبت شد. برای بررسی اثر BSATP-AgNPs بر طیف، DNA غلظت ثابت، $^{-5}$ ۱۰ × ۵۰ مولار، همراه با افزودن غلظت‌های متفاوت از BSATP-AgNPsدر بافر هپس در دمای ۲۹۸ کلوین به‌کار رفت.

اثر BSATP-AgNPs بر ساختار دوم HSA و BSA به روش طیف‌سنجی CD مطالعه شد. طیف‌ها در گستره ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر در سل کوارتز ۱ سانتی‌متر ثبت شد. طیف دورنگ‌نمایی دورانی محلول $^{-6}$ ۱۰ ×۳/۰ مولار از HSA و BSA در نبود و بودن مقادیر متفاوت نانوذره‌ها BSATP-AgNPs در دمای ۲۹۸ کلوین بررسی شد.

اندازه‌گیری گران‌روی

چگونگی تغییرات گران‌روی نسبی $(\eta/\eta_o)^{1/3}$ محلول در اثر برهم‌کنش با BSATP-AgNPs در این پژوهش بررسی شد. گران‌روی ۱۵ میلی‌لیتر از محلول ct- DNA با غلظت $^{-5}$ ۱۰ ×۵/۰ مولار به تنهایی و همراه با مقادیر متفاوت از BSATP-AgNPsدر دمای ۲۹۸ کلوین اندازه‌گیری شد. گران‌روی با معادله ۱ محاسبه شد.

$$\eta_0 = (t_{DNA}-t_0)/t_o \qquad (۱)$$

که در آن، t مدت لازم برای عبور نمونه DNA مورد نظر و t_0مدت لازم برای عبور بافر است [۱۴]. در ابتدا زمان عبور ۱۵ میلی‌لیتر بافر از لوله موئین و زمان لازم برای عبور محلول ct-DNA تنها، اندازه‌گیری شد. سپس، محلول‌های ct-DNAهمراه با مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs تهیه و زمان لازم برای انتقال محلول‌ها از بین لوله موئین حداقل سه بار برای هر محلول اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر قدرت یونی

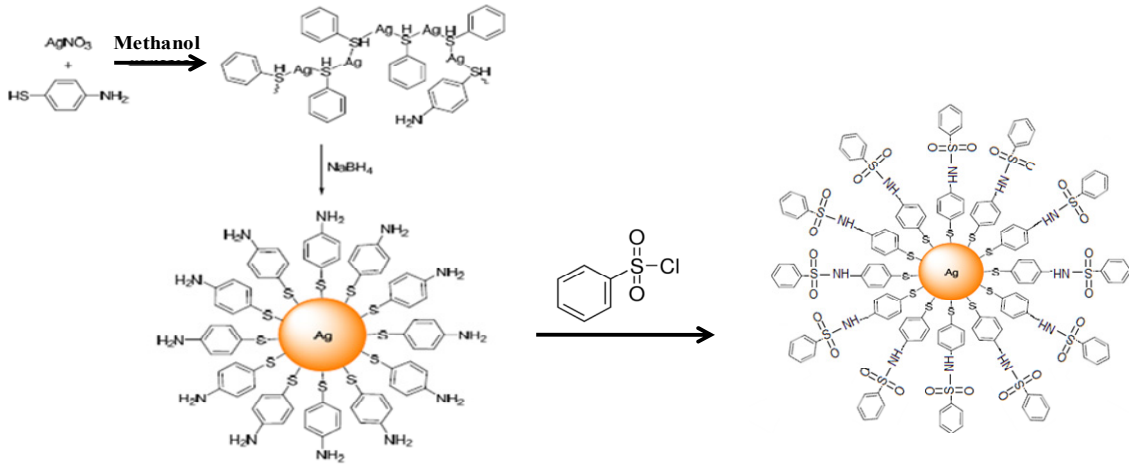
در این بررسی از محلول مادر سدیم کلرید ۴ مولار در بافر هپس ۰/۰۵ مولار استفاده شد. برای مطالعه اثر قدرت یونی طیف‌سنجی جذبی فرابنفش– مرئی به‌کار رفت. بدین منظور در یکی از نسبت‌های غلظتی مشخص از DNA و BSATP-AgNPsو مقادیر متفاوت از نمک NaCl افزوده شد و طیف‌های جذبی ثبت شد.

نتیجه‌ها و بحث

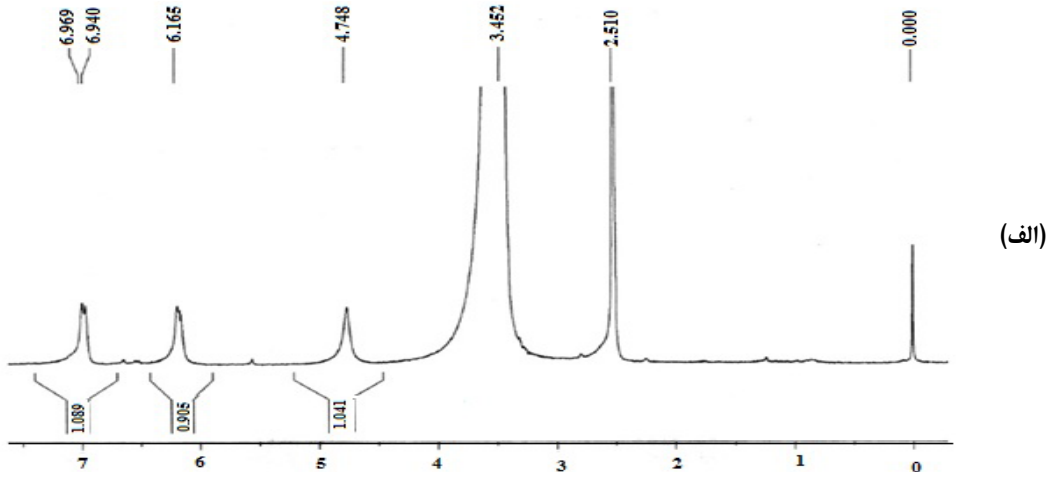
ویژگی‌های نانوذره‌های نقره BSATP-AgNPs شکل ۱ طرح‌واره تهیه مستقیم نانوذره‌های نقره عامل‌دارشده با ۴-بنزن‌سولفونامیدتیوفنل را نشان می‌دهد. در نانوذره‌های فلزی پدیده تشدید پلاسمون سطحی به شعاع نانوکره و ضریب شکست محیط اطراف آن بستگی دارد و موجب ویژگی‌های

نوری بی‌همتا آنهاست [۱۵]. پیک جذبی نانوذره‌های نقره در گستره ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر قراردارد (شکل ۵).

برای اثبات عامل‌دارشدن نقره از روش رزونانس مغناطیسی هسته استفاده شد. طیف ^1H NMR نانوذره نقره عامل‌دارشده با ۴-آمینوتیوفنل در شکل ۲-الف نشان داده شده است. دو پیک دوتایی در ۶٫۹۵ و ۶٫۱۰ ppm مربوط به پروتون‌های موقعیت ارتو نسبت به گروه تیول و دیگر پروتون‌های ارتو نسبت به گروه آمین است. پیک پهن ناحیه ۴٫۷۵ ppm به گروه NH_2 اختصاص دارد. در شکل ۲-ب، طیف ^1H NMR مربوط به نانوذره‌هایی است که با گروه بنزن سولفونیل عامل‌دار شده‌اند. دو گروه پروتون به‌صورت چندتایی در ناحیه ۷٫۵۶ ppm و ۷٫۳ و به ترتیب مربوط به پروتون‌های ارتو نسبت به گروه سولفونیل و سه پروتون دیگر است که در ناحیه آروماتیک قرار گرفته است [۱۱، ۱۶ و ۱۷].

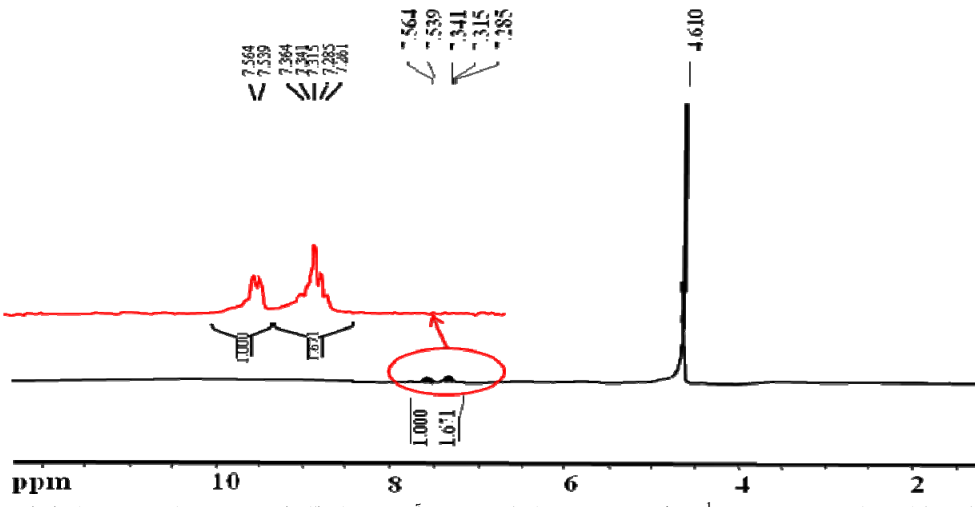


شکل۱ طرح‌واره تهیه مستقیم نانوذره نقره عامل‌دارشده با ۴-بنزن‌سولفونامیدتیوفنل (BSATP-AgNPs)



(الف)

شکل ۲ طیف‌های ^1H NMR نانوذره‌های نقره عامل‌دارشده با ۴-آمینوتیوفنل (الف) و ۴-بنزن‌سولفونامیدتیوفنل (ب)

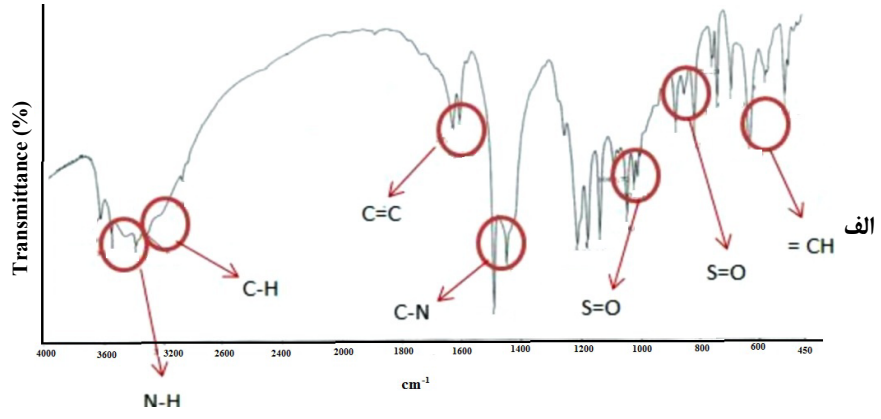


(ب)

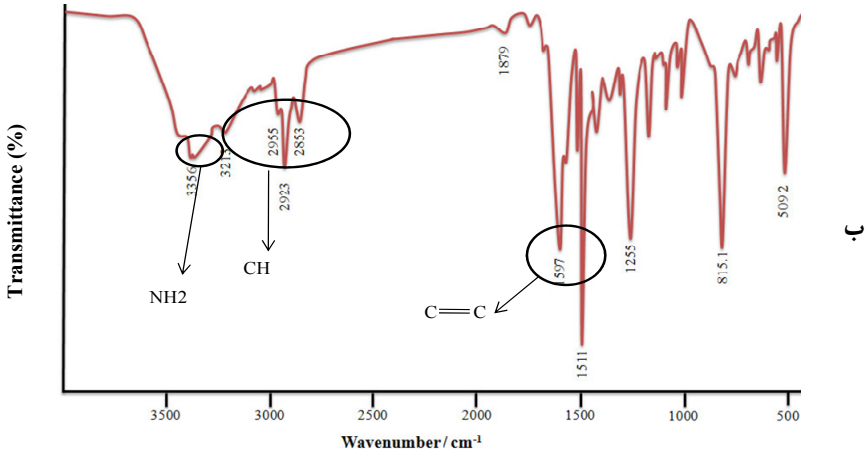
ادامه شکل ۲ طیف‌های ^{1}H NMR نانوذره‌های نقره عامل‌دارشده با ۴-آمینوتیوفنل (الف) و ۴-بنزن‌سولفونامیدتیوفنل (ب)

برای شناسایی ماهیت سطح نانوذره‌های نقره عامل‌دارشده، طیف‌های FTIR آن‌ها در شکل ۳ آورده شده است. حضور پیک‌های ارتعاشی در ناحیه ۳۳۵۶ (NH_2)، ۲۸۵۳ تا ۲۹۵۵ (C-H) و ۱۴۷۰ تا ۱۵۹۷ cm^{-1} (C=C آروماتیک) در شکل۳-الف شاهدی بر قرار گرفتن ۴-آمینوتیوفنل بر نانوذره‌های نقره است. پیک‌های ارتعاشی در شکل ۳-ب مربوط به طیف فروسرخ نانوذره‌های BSATP-AgNPs که در ۳۳۰۰ تا ۳۶۰۰ (NH)، ۳۰۶۰ (CH)، ۱۵۹۰ تا ۱۶۲۰ (C=C)، ۱۴۸۹ (CN)، ۱۰۸۰ و ۸۷۰ (S=O) و ۶۳۳cm^{-1} (=CH) پدیدار شده‌اند، دلیلی بر تهیه موفق نانوذرات BSATP-AgNP است [۱۶].

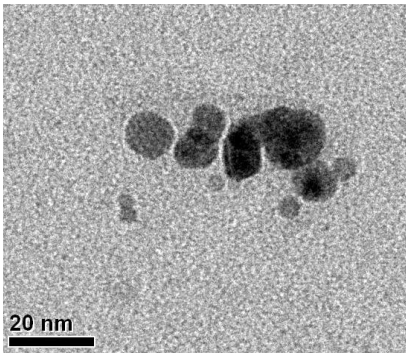
اندازه و شکل نانوذره‌های تولیدی با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تعیین شد. شکل ۴ تصویر TEM از پودر نانوذره‌های نقره را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل، نانوذره‌های نقره کروی با میانگین اندازه ۱۰ تا ۱۲ نانومتر است.



الف



شکل ۳ طیف‌های FTIR نانوذره‌های نقره عامل‌دارشده با ۴-آمینوتیوفنل (الف) و ۴-بنزن‌سولفونامیدتیوفنل (ب)



شکل ۴ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذره‌های نقره BSATP-AgNPs

مطالعه بر همکنش BSATP-AgNPs با DNA تیموس گوساله طیف‌سنجی جذبی فرابنفش- مرئی

طیف‌سنجی جذبی فرابنفش- مرئی روش مناسبی برای بررسی برهم‌کنش مولکول‌های متفاوت با DNA است [۱۸ و ۱۹]. مولکول DNA به دلیل انتقالات π به π* مربوط به جفت بازهای DNA پیک بیشینه جذبی (λ_{max}) در طول موج ۲۶۰ نانومتر دارد. برهم‌کنشDNA با لیگاندهای متفاوت، می‌تواند λ_{max} و ضریب جذب مولی (ε) را تغییر دهد. این تغییرها طیفی می‌تواند به‌صورت اثر بیش‌رنگی[1] (افزایش در شدت جذب)، اثر کم‌رنگی[2] (کاهش شدت جذب)، انتقال‌به‌سرخ[3] (انتقال به سمت طول موج‌های بیشتر – جابه‌جایی سرخ) و انتقال‌به‌آبی[4] (انتقال به طول موج‌های کمتر – جابه‌جایی آبی) باشد. تغییر الگو روی هم افتادگی بازهای DNA، شکسته‌شدن پیوندهای هیدروژنی بین لایه‌های مکمل موجود در ساختار DNA، شکسته‌شدن پیوندهای کووالانسی بین جفت بازهای DNA و تغییر در ساختار مارپیچ و صورت‌بندی DNA موجب ایجاد تغییرات در طیف جذبی می‌شود [۱۹ و ۲۰].

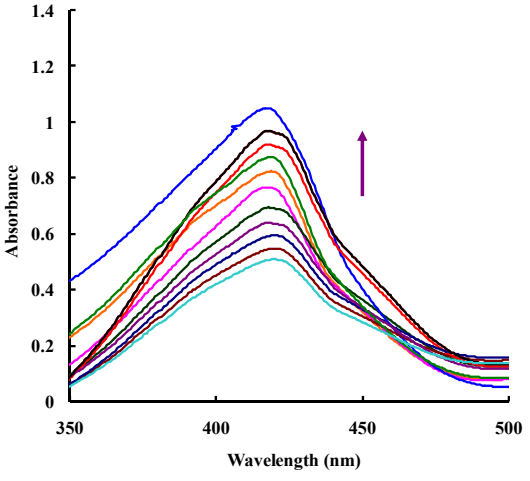
طیف جذبی فرابنفش-مرئی مربوط به تیترکردن نانوذره‌های BSATP-AgNPs در محلول بافر هپس با افزایش ct-DNAدر شکل ۵-الف آورده شده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود با هر بار افزودن DNA به سل حاوی نانوذره‌ها تغییرات مشهودی در طیف جذبی BSATP-AgNPs رخ می‌دهد. این تغییرها در طیف جذبی BSATP-AgNPs به شکل

1. Hyperchromic effect
2. Hypochromic effect
3. Bathochromic shift
4. Hypsochromic shift

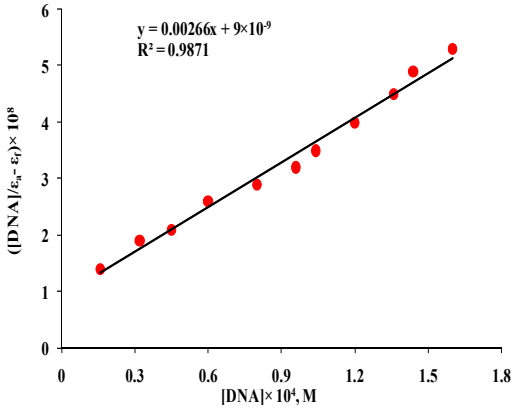
افزایش شدت در ۴۱۰ نانومتر با تغییر کمی در طول موج بیشینه است.

جابه‌جایی کوچکتر از ۷ نانومتر یا عدم وجود جابه‌جایی در طول موج جذبی می‌تواند دلیل بر پیوند شیاری باشد. همچنین، تغییر جزیی در طول موج جذب در این نوع پیوند می‌تواند نشان‌دهنده تغییر در قطبیت اطراف مولکول باشد. تحت شرایطی که جابه‌جایی در طول موج کم است نمایانگر پیوند ضعیف دارو با جفت بازها است و پیش‌بینی می‌شود برهم‌کنش با شیارهای کوچک با بی‌نظمی کمی در ساختار DNAهمراه باشد [۱۹ تا ۲۱]. با توجه به افزایش در شدت جذب همراه با هیپسوکرومی کمتر از ۷ نانومتر، نوع پیوند الکترواستاتیک برای برهم‌کنشBSATP-Ag NPs با DNA پیشنهاد می‌شود. به منظور محاسبه ثابت پیوند BSATP-AgNPs با DNA به روش طیف‌سنجی جذبی فرابنفش–مرئی تیترکردن غلظت ثابتی از BSATP-AgNPs با DNA انجام شد. اگر فرض شود که پس از تیترکردن محلول، تعادل زیر برقرار می‌شود از معادله ولف–اشمیر (معادله ۲) می‌توان برای محاسبه ثابت پیوند استفاده کرد [۲۲].

الف



ب



شکل ۵ طیف جذبی فرابنفش–مریی محلول $۵/۰ \times ۱۰^{-۵}$ مولار نانوذره‌هایBSATP-AgNPs در حضور غلظت‌های متفاوت از DNA ($۰/۰ - ۱/۶۰ \times ۱۰^{-۴}$) مولار در دمای ۲۹۸ کلوین و در pH= ۷/۴ (الف) و نمودارمعادله ولف–اشمیر در برهم‌کنش نانوذره‌های BSATP-AgNPs با DNA در دمای ۲۹۸ کلوین (ب)

واکنش ۱

$$\text{DNA} + \text{BSATP-AgNPs} \leftrightarrow \text{BSATP-AgNPs-DNA}$$

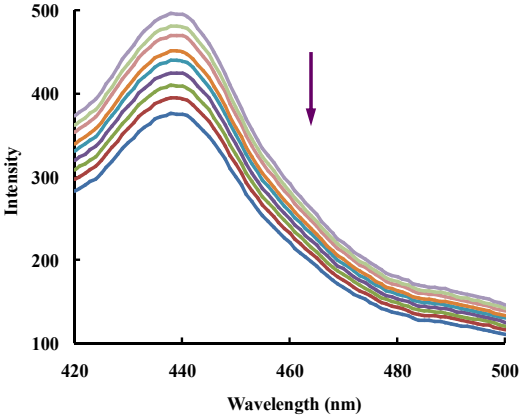
$$([DNA]/(\varepsilon_a-\varepsilon_f)) = ([DNA]/(\varepsilon_b-\varepsilon_f)) + (1/K_b(\varepsilon_b-\varepsilon_f)) \quad (۲)$$

که در آن، [DNA] غلظت DNA افزوده شده و ε_fضریب جذب مولی برای BSATP-AgNPs در حالت آزاد، ε_b ضریب جذب مولی BSATP- AgNPs در کمپلکس و ε_aضریب جذب ظاهری است. با رسم نمودار (شکل ۵–ب) و استفاده از معادله ولف–اشمیر ثابت پیوند محاسبه شد. ثابت پیوند از نسبت شیب به عرض از مبدأ نمودار به‌دست آمد. مقدار K_b به دست آمده برابر با $(۰/۹) \times ۱۰^{۵}$ M^{-1} ± ۳/۰ بود که قابل مقایسه با مقادیر گزارش‌شده برای پیونددهنده‌های الکترواستاتیک و شیاری است [۲۳ و ۲۴].

طیف‌سنجی فلوروسانس

مطالعه بر طیف فلورسانس درشت‌مولکول‌ها و به‌ویژه خاموش‌شدن فلورسانس، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد

ساختار فضایی درشت‌مولکول، جایگاه‌های پیوند، برهم‌کنش حلال، درجه انعطاف‌پذیری، فواصل درون مولکولی و غیره به‌دست دهد. در واقع خاموش‌شدن فلورسانس به فرایندی گفته می‌شود که موجب کاهش شدت فلورسانس نمونه شود [۲۵]. شکل ۶ تغییرات نشر فلورسانس نانوذره‌ها BSATP-AgNPs با افزایش DNAرا در نسبت‌های مولی متفاوت نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، تغییرها منظم و با افزایش DNA شدت فلورسانس کمپلکس کاهش یافته است.



شکل ۶ طیف فلورسانس محلول $۵/۰ \times ۱۰^{-۶}$ مولار نانوذرات BSATP-AgNPs در حضور غلظت‌های متفاوت از DNA ($۳/۰ \times ۱۰^{-۴}$ – ۰/۰) مولار در ۲۹۸ کلوین و در pH = ۷/۴

به‌طور خلاصه، خاموشی فلوورسانس از راه سازوکارهای دینامیک و استاتیک صورت می‌گیرد [۲۵]. در خاموشی استاتیک، در حالت پایه مولکول، بین نشردهنده و خاموش‌کننده پیوند برقرارشده و گونه جدیدی تشکیل می‌شود که نشر ندارد. ازاین‌رو، شدت فلوئورسانس نشردهنده خاموش می‌شود. درحالی‌که در خاموشی دینامیک یا برخوردی، نشردهنده در حالت برانگیخته یا خاموش‌کننده برخورد می‌کند و درنتیجه موجب از دست رفتن انرژی به صورت غیرتابشی و خاموشی فلورسانس می‌شود. برای پی‌بردن به انواع سازوکار خاموشی (استاتیک یا دینامیک یا هر دو) می‌توان از وابستگی خاموشی به عواملی مانند غلظت خاموش‌کننده و دما استفاده کرد.

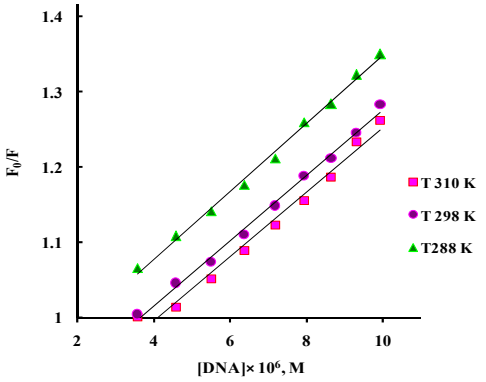
معادله استرن–ولمر (معادله ۳) رابطه مقدار خاموشی به غلظت خاموش‌کننده را نشان می‌دهد.

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \qquad (۳)$$

که در آن، F_0 و F به‌ترتیب شدت فلوئورسانس نانوذرات BSATP-AgNPs در نبود و بودن خاموش‌کننده DNA، K_{sv}ثابت خاموشی استرن ولمر، k_q ثابت سرعت خاموشی نشرکننده، τ_0طول عمر نشرکننده (در نبود خاموش‌کننده) و [Q]غلظت DNA است. رسم تغییرات F_0 / F بر حسب غلظت‌های متفاوت DNA در گستره ویژه‌ای از غلظت، خطی است و شیب خط به‌دست آمده K_{sv} است (شکل ۷). با توجه به مقدار میانگینτ_0 در درشت‌مولکول‌های زیستی ($k_q = 10^{-8}$ τ_0)محاسبه شد. تغییرهای نشر نانوذره‌ها BSATP-AgNPs با DNA در دماهای متفاوت ثبت شد. جدول ۱ نتایج بررسی داده‌ها را در دماهای متفاوت نشان می‌دهد.

افزایش دما موجب افزایش سرعت نفوذ مولکول‌ها و نیز افزایش میزان برخوردها می‌شود. در نتیجه مقدار ثابت خاموشی دینامیک با افزایش دما افزایش می‌یابد. در صورتی که سازوکار خاموشی استاتیک باشد، حالت عکس ممکن است رخ دهد، یعنی افزایش دما می‌تواند موجب سست‌شدن پیوند بین نشرکننده و خاموش‌کننده شود و درنتیجه، ثابت خاموشی کاهش یابد. داده‌های جدول ۱ حاکی از کاهش ثابت خاموشی با افزایش دما است که نشان می‌دهد به احتمال سازوکار خاموشی استاتیک است. k_q نیز با افزایش دما کاهش یافته است، مقدار آن در ۲۹۸ کلوین برابر با $۴/۳۴ \times ۱۰^{۱۲}\ M^{-1}$ بود که این مقدار بیشتر از بیشینه k_q برای خاموشی دینامیک ($۲ \times ۱۰^{۱۰}\ M^{-1}$) در درشت‌مولکول‌هاست و موید سازوکار خاموشی استاتیک است [۱۹].

مطالعه جذب فرابنفش-مرئی برای اثبات سازوکار خاموشی سودمند است. خاموشی دینامیک که از برخورد مولکول‌ها با هم به‌دست می‌آید، به‌طور معمول تاثیری در طیف جذبی ندارد ولی خاموشی استاتیک که از تشکیل کمپلکس BSATP-AgPs-DNA به‌دست می‌آید، موجب تغییر در طیف جذبی UV-Vis می‌شود. با افزودن DNA به محلول نانوذره‌ها BSATP-AgNPs مقدار جذب افزایش یافته است که می‌تواند حاکی از تشکیل کمپلکس باشد (شکل ۶).



شکل ۷ منحنی‌های استرن ولمر مربوط به خاموشی فلورسانس نانوذره‌های نقره در حضورغلظت‌های متفاوت DNA دردماهای ۲۸۸، ۲۹۸ و ۳۱۰ کلوین

جدول ۱ مقادیر محاسبه‌شده ثابت خاموشی استرن ولمر و ثابت سرعت خاموشی در دماهای متفاوت مربوط به برهم‌کنش نانوذره‌های نقره BSATP-AgNPs و DNA

T (K)	K_{sv} (M^{-1})	Kq ×10^{12} (M^{-1} S^{-1})	N
۲۸۸	۴٫۵۰ × ۱۰^{۴}	۴٫۵۰	۰٫۹۰
۲۹۸	۴٫۳۴ × ۱۰^{۴}	۴٫۳۴	۰٫۸۵
۳۱۰	۴٫۲۵ × ۱۰^{۴}	۴٫۲۵	۰٫۸۳

ثابت پیوند DNA (K_f) با نانوذره‌ها BSATP-AgNPs با استفاده از داده‌های فلورسانس به کمک معادله ۴ محاسبه شد.

$$\log (F_0\text{-}F)/F = \log K_f + n \log [Q] \qquad (۴)$$

که در آن، F_0 و F به‌ترتیب شدت فلورسانس BSATP-AgPsدر نبود و بودن مقادیر متفاوت خاموش‌کننده DNA و n استوکیومتری کمپلکس است. نتیجه‌های به‌دست آمده از معادله خطی $\log(F_0 - F)/F$ در مقابل log[Q] در دماهای متفاوت در جدول ۲ آورده شده‌اند. با افزایش دما، ثابت پیوند کاهش یافت که به‌احتمال نشان‌دهنده کاهش پایداری کمپلکس BSATP-AgNPs -DNA در دماهای بالاتر است.

جدول ۲ مقادیر محاسبه‌شده تشکیل و استوکیومتری برهم‌کنش BSATP-AgNPs با ct-DNA در دماهای متفاوت

K_f (M^{-1}) ×10^{6}	log K_f	n	T (K)
۱٫۴۱	۶٫۱۵	۱٫۳۲	۲۸۸
۱٫۱۲	۶٫۰۵	۱٫۳۲	۲۹۸
۸٫۹۰	۵٫۹۵	۱٫۳۲	۳۱۰

از داده‌های فلورسانس در دماهای متفاوت برای محاسبه عامل‌های ترمودینامیکی استفاده شد. محاسبه تغییرات آنتالپی، آنتروپی و انرژی آزاد گیبس در طی یک واکنش اطلاعات مفیدی را در ارتباط با وضعیت تعادلی در اختیار می‌دهد. ΔH^0 و ΔS^0 با استفاده از شیب و عرض از مبدأ منحنی وانت-هوف تعیین شد. این منحنی تغییرات ln K_f در مقابل 1/T است که شیب منحنی ($-\Delta H^0/R$) و عرض از مبدأ آن $\Delta S^0/R$ است.

$$\ln K_f = - (\Delta H^0/RT) + (\Delta S^0/RT) \qquad (۵)$$

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، با توجه به مقدار آنتالپی فرایند تشکیل کمپلکس در گستره دمایی موردمطالعه گرمازا است ($\Delta H^0 < 0$). با توجه به مثبت بودن آنتروپی می‌توان گفت که تشکیل کمپلکس BSATP-AgNPs-DNA منجر به افزایش بی‌نظمی در محیط می‌شود.

جدول ۳ مقادیر ترمودینامیکی به‌دست آمده برای برهم‌کنش BSATP-AgNPsو DNA

ΔG^0 (kJ mol^{-1})	ΔH^0 (kJ mol^{-1})	ΔS^0 (J^{-1} mol^{-1} S^{-1})	T (K)
۳۳٫۸۴	−۱۵٫۵۰ ± ۰٫۴۸	۶۳٫۶۸ ± ۱٫۶۳	۲۸۸
۳۴٫۴۵			۲۹۸
۳۵٫۲۵			۳۱۰

نیروهای اصلی در پیوند مولکول‌های کوچک به یک درشت‌مولکول و در آب به‌طور اصلی شامل برهم‌کنش واندروالسی، برهم‌کنش الکترواستاتیک و اثر آب‌گریزی (رهایی مولکول از لایه آبپوشی به داخل توده حلال) است. تیماشف، رز و سابرامانین [۲۶] روابط بین عامل‌های ترمودینامیکی و فرایند درگیر در پیوند را مشخص کردند، برپایه این نظریه:

– اگر $\Delta H^0 < 0$ و $\Delta S^0 > 0$ باشد، فرایند اصلی درگیر در ایجاد پیوند، یونی است.

– هنگامی‌که $\Delta S^0 < 0$ و $\Delta H^0 < 0$ باشد فرایند اصلی درگیر در ایجاد پیوند، واندروالسی یا تشکیل پیوند هیدروژنی است.

– هنگامی‌که $\Delta S^0 > 0$ و $\Delta H^0 > 0$ فرایند اصلی درگیر در ایجاد پیوند، پیوستگی آب‌گریزی است.

برپایه داده‌های تغییرهای آنتالپی (ΔH^0) و تغییرات آنتروپی (ΔS^0) ، مدل برهم‌کنش بین دارو و درشت‌مولکول زیستی قابل پیش‌بینی است [۲۶]. با توجه به اینکه در این مطالعه $\Delta H^0 <$ 0و $\Delta S^0 > 0$ بود (جدول ۳) پیش‌بینی می‌شود که فرایند اصلی درگیر در ایجاد پیوند BSATP-AgNPs به DNA، یونی باشد.

طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی (CD)

طیف CD در گستره طول موج فرابنفش–مرئی اطلاعات مهمی در مورد صورت‌بندی اسیدهای نوکلئیک محلول فراهم می‌آورد. با دورنگ‌نمایی دورانی می‌توان نوع پیوند لیگاند به DNA را تشخیص داد، ولی نمی‌توان جایگاه دقیق پیوند را مشخص کرد. مشخص طیف CD مربوط به B-DNAراست گرد یک نوار منفی در ۲۴۵ نانومتر و یک نوار مثبت در ۲۷۵ نانومتر است [۲۰]. طیف منفی متناظر با ساختار مارپیچ دوگانه DNA و طیف مثبت متناظر با روی هم افتادگی جفت‌بازهای DNA است. داروها بسته به ساختارشان اثرات متفاوتی بر صورت‌بندی DNA می‌گذارند. اثر افزایش مقادیر BSATP-AgNPs بر طیف دورنگ‌نمایی DNA خالص بررسی شد. طیف‌های CD نشان داد که افزایش نانوذره‌های AgNPs–BSATP به DNA موجب افزایش شدت نوار منفی همراه با یک جابه‌جایی اندک (نانومتر ۳ ≈) و کاهش شدت نوار مثبت شد. طیف CD شامل یک گروه مثبت در ۲۷۵ نانومتر به‌دلیل انباشتگی پایه و یک گروه منفی در ۲۳۵ نانومتر با توجه به مارپیچی شکل‌بودن است. پیوند شیار ساده و برهم‌کنش الکترواستاتیک مولکول‌های کوچک با DNA هیچ اختلالی در شدت دو نوار ایجاد نمی‌کند یا اینکه اختلال کمی به‌وجود می‌آید. DNA با BSATP–AgNPs اختلال کمی از دو نوار را نشان می‌دهد که بیانگر تعامل غیرجای‌گیری بین‌لایه‌ای BSATP-AgNPs و DNA، همچنین، نوع پیوند شیاری است. تغییرهای مشاهده‌شده قابل مقایسه با نتایج گزارش‌شده در مقالات مشابه است. برخی پژوهشگران معتقدند که افزایش و کاهش مشاهده‌شده در نوارهای مثبت و منفی، ممکن است اشاره به انتقال ساختار B-DNA به سمت A-DNA باشد [۲۷]. برخی از پژوهشگران نیز معتقدند که این پدیده ناشی از پیوند به شیارهای DNA است که موجب پایداری B-DNA می‌شود. برخی دیگر معتقدند که افزایش نوار مثبت DNA در نتیجه اختلال در ساختار DNA است [۲۸]. در پژوهشی از احمدی و همکارانش، روش طیف‌سنجی دورنگ‌نمائی دورانی برای مطالعه تغییرهای ساختاری DNA در برهم‌کنش با ترکیب ۲–ایمیدازولیدینتیون به‌کارگرفته شده است. تغییرات CD آن

نشان می‌دهد که نوار ۲۴۵ نانومتر شدتش را کم کرده و (≈ ۳ نانومتر) به سمت طول موج‌های بلندتر جابه‌جا شده درحالی‌که نوار مثبت در ۲۷۵ نانومتر یک افزایش جزئی به سمت مقادیر مثبت داشته است. در پژوهش آن‌ها حدس زده‌شد که افزایش در نوار ۲۷۵ نانومتر در اثر تغییرات در الگو روی هم افتادگی جفت‌بازها است. در محلول‌های آبی، DNA یک مولکول صلب نیست، و مولکول‌های آب نقش مهمی روی صورت‌بندی DNA ایفا می‌کنند. برهم‌کنش ۲-ایمیدازولیدینتیون با شیارهای کوچک DNA به‌صورت یک رقابت بین مولکول‌های آب که DNA در آن حل‌شده، اتفاق می‌افتد. بنابراین، آب موجود در محیط کوچک اطراف DNA کاهش یافته و صورت‌بندی DNA از شکل B به شکل A تغییر می‌کند [۲۹]. بنابراین، حدس زده می‌شود تغییرهای مشاهده‌شده می‌تواند ناشی از تغییرصورت‌بندی B-DNA به A-DNA از راه برهم‌کنش با شیارهای DNA باشد.

اندازه‌گیری گران‌روی

داده‌های اسپکتروسکوپی برای مطالعه برهم‌کنش لازم، اما کافی نیستند. تغییرهای هیدرودینامیک حلال نسبت به افزایش طول درشت‌مولکول‌های حل‌شده در آن‌ها بسیار حساس هستند. بنابراین، می‌توان برای مطالعه برهم‌کنش در محلول و در نبود داده‌های بلورشناسی و NMR، از گران‌روی استفاده کرد [۲۷]. ترکیب‌های جای‌گیرنده بین‌لایه‌ای کلاسیک معروف ازجمله اتدیوم برمالید و پروفلاوین موجب افزایش گران‌روی نسبی محلول‌های DNA می‌شوند. این افزایش نتیجه قرارگرفتن مولکول‌های این ترکیب‌ها بین بازهای DNA و بازشدن رشته DNA و طویل‌شدن مارپیچ دو رشته‌های DNA است. در مقابل یک بین‌لایه‌ای شدن جزئی یا جای‌گیری بین‌لایه‌ای غیرکلاسیک لیگاند مارپیچ DNA را خم کرده و طول مؤثر آن و به‌طور هم‌زمان گران‌روی را کاهش دهد [۳۰]. مولکول DNA یک مولکول پلی‌آنیون است و به دلیل وجود دافعه بارهای منفی در آن، یک مولکول گسترده و طویل است. زمانی که کاتیون‌ها (مانند یک کاتیون فلزی) با پیوند الکترواستاتیک با گروه‌های فسفات بر هم‌کنش می‌دهند، اندکی از بار منفی DNA را خنثی می‌کنند که موجب انقباض رشته DNA و کاهش گران‌روی آن می‌شوند [۳۱]. لیگاندهایی که با شیارهای DNAپیوند می‌خورند موجب ایجاد تغییرهای مثبت یا منفی می‌شوند که مقدار این تغییرها اندک بوده یا هیچ اثری در گران‌روی DNA ندارند [۲۷]. نمودار تغییرهای گران‌روی نسبی ($\eta/\eta_0^{1/3}$) محلول DNA در مقابل R (نسبت غلظت [BSATP-AgNPs]/[DNA]) در حضور مقدارهای متفاوت BSATP-AgNPs در محلول رسم شد. تغییرات جزیی گران‌روی DNA با افزایش نانوذرات نقره مشاهده شد که نشان‌دهنده پیوند ضعیف BSATP-AgNPs با DNA در ناحیه شیاری است [۳۱].

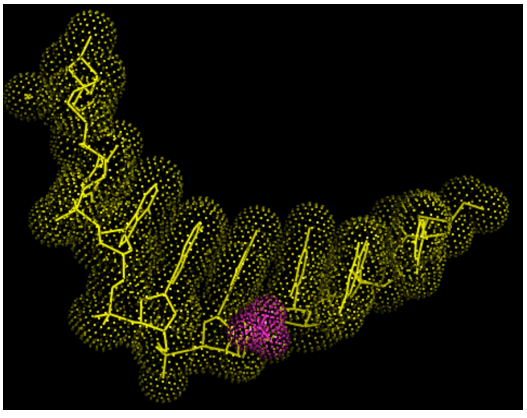
بررسی اثر قدرت یونی بر برهم‌کنش DNA با نانوذره‌ها BSATP-AgNPs

مطالعه اثر قدرت یونی روشی کارآمد برای تشخیص نوع پیوند دارو به DNA است. اگر دارو بین جفت‌بازهای مجاور هم از DNA جای‌گیری کند، تغییرهای محیطی را حس نمی‌کند زیرا ترکیبی که جای‌گیری بین‌لایه‌ای می‌کند تحت حفاظت جفت‌بازهای بالایی و پایینی است. در نوع پیوند شیاری چون مولکول دارو بیشتر در دسترس حلال قرار دارد، حساس به تغییرهای محیط است و گرچه با افزایش قدرت یونی، پیوند بین مولکول و مارپیچ سست می‌شود، ولی برای مولکول‌های پیوندشده شیاری سخت است که به داخل دارو نفوذ کنند [۲۷]. در نوع پیوند یونی، مولکول دارو متصل به DNA با افزایش قدرت یونی وارد یک رقابت با یون‌های نمک در پیوند به DNA شده و در داخل محلول آزاد می‌شود. این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت نمک، جذب فرابنفش-مرئی محلول

کاهش یافته است که نشان‌دهنده رقابت یون Na^+ با نانوذره‌های نقره در پیوند به DNA بوده و تعیین‌کننده نوع پیوند است.

مطالعه‌های مدل‌سازی مولکولی برهم‌کنش نانوذره‌ها و DNA

پژوهش‌های داکینگ، چندین دیدگاه از برهم‌کنش بین لیگاند و درشت‌مولکول را فراهم می‌کند که می‌تواند نتیجه‌های آزمایشگاهی را تایید کند. پیوند دهنده‌های شیارهای کوچک به منظور قرارگیری در انحنای باریک شیار مارپیچ و با جابه‌جایی مولکول آب اجازه چرخش پیچشی را به آن می‌دهد [۳۲]. مطابق با نتیجه‌های به دست آمده از مطالعات داکینگ صورت‌بندی مولکول ۴-BSATP-AgNPs پس از پایدارشدن انرژی با مدل‌سازی، انحنای طبیعی شیار کوچک B- DNA است [۳۳] (شکل ۷).



شکل ۷ نتایج داکینگ مولکولی بررسی ساختار سه بعدی برهم-کنش BSATP-AgNPs باتوالی B–DNA در تشکیل جهت‌گیری بهینه و محل پیوند BSATP-AgNPs

بررسی برهم‌کنش HSA و BSA با نانوذره‌های نقره عامل‌دارشده با ۴-بنزن‌سولفونامیدتیوفنل

طیف‌سنجی جذبی فرابنفش- مرئی

طیف‌سنجی جذبی UV-Vis یک روش ساده وکاربردی به منظور مطالعه برهم‌کنش بین سرم آلبومین و BSATP-AgNPsاست. HSA دارای یک نوار جذبی بزرگ در ۲۰۰ تا ۲۳۰ نانومتر به دلیل انتقالات الکترونی π به π^* در CO اسکلت پلی‌پپتیدی ساختار و نوار جذبی دوم با بیشینه جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر ناشی از اسکلت پلی‌پپتیدی و باقی‌مانده‌های آمینواسید آروماتیک به‌ویژه تریپتوفان است [۳۴].

باقی‌مانده‌های آمینو اسید، به‌ویژه تریپتوفان، به محیطی که در آن قرار دارند حساس هستند. تغییر در صورت‌بندی و قطبیت محیط اطراف می‌تواند شدت جذب یا طول موج بیشینه جذب را تغییر دهد.

تغییرهای طیف جذبی HSA و BSA در نبود و بودن غلظت‌های متفاوت BSATP-AgNPs در دمای ۲۹۸ کلوین بررسی شد. برپایه نتایج به‌دست آمده از مطالعات، شدت جذب HSA و BSA بدون جابه‌جایی در طول موج بیشینه جذب در ۲۸۰ نانومتر با افزودنBSATP AgNPs کاهش یافت. کاهش جذب با افزایش غلظت BSATP-AgNPs، تغییر در صورت‌بندی HSA و BSA به دلیل تشکیل یک گونه جدی پروتئین–BSATP-AgNPs را نشان می‌دهد. پیوند پپتیدی ویژگی جزئی دوگانه دارد، پیوند BSATP-AgNPs به آلبومین ممکن است مانع از چرخش اطراف پیوند پپتیدی و درنتیجه منجر به تغییر در صورت‌بندی پروتئین شود. دلیل دیگر تغییر صورت‌بندی می‌تواند گسترده‌ترشدن رشته مولکول پروتئین بر اثر افزایش BSATP AgNPs به پروتئین باشد، این امر ممکن است قطبیت اطراف تریپتوفان را تغییر دهد. از این‌رو، آب‌گریزی را نیز تغییر می‌دهد [۳۴].

همان‌طور که از قبل مطرح شد، خاموشی دینامیک هیچ اثری بر طیف جذبی مولکول ندارد. کاهش در طیف جذبی HSAو BSA با افزودن BSATP-AgNPs نشان‌دهنده وجود برهم‌کنش بین BSA – BSATP-AgNPs و HAS – BSATP-AgNPs و خاموشی استاتیک است. تغییرها در نوارجذبی دوم در ۲۸۰ نانومتر ممکن است حاکی

از تغییر در محیط اطراف تریپتوفان به‌دلیل حضور BSATP AgNPs باشد.

مطالعه‌های انتقال انرژی فلورسانس

طیف‌سنجی فلورسانس روشی کارآمد در مطالعه برهم‌کنش درشت‌مولکول‌ها یا ترکیب‌های دارویی است. مطالعه طیف‌سنجی‌فلوئورتابی برهم‌کنش HSA و BSA برپایه این واقعیت است که باقی‌مانده‌های تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آنالین در پروتئین‌ها دارای فلوئورسانس ذاتی هستند. ازآنجاکه فنیل‌آنالین بهره کوانتومی پایینی دارد و تیروزین به‌طورمعمول یونیده می‌شود و یا نزدیک گروه‌های آمینو، گروه کربوکسیل یا باقی‌مانده تریپتوفان خاموش می‌شود، نشر فلوئورسانس باقی‌مانده تیروزین نیزکم است. ازاین‌رو، شدت نشر فلوئورسانس ذاتی HSA و BSA بیشتر ناشی از باقی‌مانده تریپتوفان است [۳۴ و ۳۵].

برای مطالعه پیوند BSATP-AgNPs به آلبومین سرم انسانی و آلبومین سرم گاوی، طیف فلورسانس HSA و BSAدر گستره ۳۰۰ تا۴۵۰ نانومتر در نبود و بودن مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs ثبت شد. نشر فلورسانس بدون جابه‌جایی در طول موج بیشینه با افزورن مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs خاموش شد طول موج بیشینه نشر تریپتوفان داخل پروتئین در محیط آبی بر اثر عدم تاخوردگی پروتئین از طول موج‌های پایینتر به بالاتر جابه‌جا می‌شود و شدت نشر تریپتوفان داخل پروتئین‌های بزرگ و طیف نشری آن منعکس‌کننده میانگین از محیط تریپتوفان است. همجنین، تغییر در نشر تریپتوفان، به‌دلیل تغییر درصورت-بندی پروتئین است [۳۴ تا ۳۶]. خاموشی مشاهده‌شده در طیف فلورسانس HSA و BSA پس از افزودن BSATP-AgNPs ناشی از تغییر در صورت‌بندی پروتئین و نشان‌دهنده وجود برهم‌کنش بین BSATP-AgNPs با BSA و HSA است.

مطالعه خاموشی فلورسانس HSA و BSA

همان‌طور که پیش از این بیان شد، خاموشی فلورسانس از راه سازوکارهای دینامیک و استاتیک صورت می‌گیرد و به‌منظور تشخیص نوع سازوکار خاموشی (استاتیک یا دینامیک و یا هر دو) می‌توان از وابستگی خاموشی به عواملی مانند غلظت خاموش‌کننده و دما استفاده کرد. از معادله استرن – ولمر برای بررسی سازوکار خاموشی نانوذره‌های BSATP AgNPs با HSA و BSA در دمای ۲۹۸ کلوین استفاده شد. به طورکلی انحراف مثبت از خطی بودن منحنی استرن – ولمر زمانی اتفاق می‌افتد که ترکیبی از خاموشی استاتیک و دینامیک روی داده باشد [۳۷] و یا با افزایش غلظت خاموش‌کننده ماهیت درشت‌مولکول تغییر کرده و موجب تغییر روند خاموشی‌شده باشد. منحنی خطی استرن – ولمر به طورکلی نشان‌دهنده یک نوع نشرکننده در پروتئین است که دسترسی یکسانی به خاموش‌کننده دارند. همچنین، می‌تواند به این معنی باشد که تنها یک سازوکار خاموشی دینامیک یا استاتیک اتفاق افتاده است. همچنین، برپایه بررسی‌های افتینک [۳۸]، مشخص‌شده که اگر فرض شود که سازوکار خاموشی فلوئورسانس دینامیک باشد با مشاهده انحراف مثبت مشخص می‌شود که فرایند خاموشی استاتیک اضافی اتفاق افتاده است (معادله ۷).

$$F_0/F = 1 + K_D[Q]\,(1 + K_s[Q]) \qquad (۷)$$

که‌درآن، K_D ثابت فرونشانی دینامیک و K_S ثابت خاموشی استاتیک است. اگر K[Q] خیلی کوچک باشد برپایه بسط مک‌لورن $K[Q] = \exp K[Q]$ + ۱ که در اینجا مقدار $K_D[Q]$ کوچک و K_D به صورت V نام‌گذاری‌شده است. پس به منظور تعیین ثابت خاموشی استاتیک و دینامیک، رابطه اصلاح‌شده استرن ولمر به کار برده شده است [۳۹].

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q]\,(\exp V[Q]) \qquad (۸)$$

در ایـن معادلـه K_{SV} ثابـت خاموشـی اسـترن – ولمـر (خاموشی استاتیک)، V ثابت خاموشی دینامیـک، F_0 و F بـه ترتیب شدت فلوئورسانس در نبـود و بـودن مقـادیر متفـاوت BSATP-AgNPs اسـت BSATP-AgNPs غلظـت [Q] و NPs رسم تغییـرات F_0/F بـر حسـب [Q]exp(V[Q]) در گستره ویژه‌ای از غلظت خطـی اسـت کـه شـیب خـط K_{SV} اسـت. مقـدار V (ثابـت خاموشـی دینامیـک) بـا $(F_0/F)^{-1}$ [exp(V[Q]در مقابل [Q] توسط تغییـر V تـا دسـتیابی یـک منحنی خطی محاسبه شد. مقدار Vو K_{SV} در دماهای ۲۸۸، ۲۹۸، ۳۱۰ کلوین به‌دست آمد. داده‌های جـدول ۴ مشـخص مـی‌کنـد کـه بـه احتمـال سـازوکار خاموشـی بـا BSATP AgNPs، خاموشی استاتیک است، چراکه K_{SV} با افزایش دما کاهش یافته و V نشان‌دهنـده ثابـت خاموشـی دینامیـک بـا افزایش دما، افزایش یافته است.

جدول ۴ مقادیر محاسبه‌شده ثابت خاموشی و ثابت سرعت خاموشی HSA و BSA با نانوذره‌های BSATP AgNPs در دماهای متفاوت و pH = ۷٫۴

نمونه	T(K)	$K_q(M^{-1}S-1)\times10^{12}$	$K_{SV}(M_4^{-1})\times10$	R^2
HSA	۲۸۸	۹٫۹۶	۴٫۹۸	۰٫۹۸
	۲۹۸	۲٫۶۰	۱٫۳۰	۰٫۹۷
	۳۱۰	۱٫۸۶	۰٫۹۳	۰٫۹۲
BSA	۲۸۸	۱۱٫۴۶	۵٫۸۳	۰٫۹۸
	۲۹۸	۷٫۸۸	۳٫۸۹	۰٫۹۸
	۳۱۰	۵٫۵۲	۲٫۷۶	۰٫۹۹

ثابت پیوند و تعداد جایگاه‌های پیوند برای برهم‌کنش BSATP-AgNPs با HSA و BSA می‌تواند از اطلاعات و داده‌های خاموشی فلوئورسانس مطابق با معادله ۴ به‌دست آید. در این معادله F_0 و F به‌ترتیب شدت نشر فلورسانس HSA و BSA در نبود و بودن BSATP-AgNPs، n استوکیومتری پیوند و [Q] غلظت خاموش‌کننده (BSATP-AgNPs) هستند.

با رسم منحنی $\text{Log } F_0\text{-}F/F$ در مقابل Log [Q] ثابت پیوند از عرض از مبدأ منحنی خطی قابل محاسبه است. نتایج نشان داد که ثابت پیوند با افزایش دما کاهش می‌یابد (جدول ۵). این کاهش به‌احتمال مربوط به کاهش پایداری گونه‌های BSATP-AgNPs-HSA و BSATP-AgNPs-BSA در دماهای بالاتر است.

جدول ۵ مقادیر محاسبه‌شده ثابت پیوند و استوکیومتری برهم‌کنش BSATP-AgNPs با HSA و BSA در دماهای متفاوت

نمونه	T(K)	n	$\log K_f$	R^2
HSA	۲۸۸	۱٫۱۰	۵٫۲۲	۰٫۹۸
	۲۹۸	۱٫۰۹	۴٫۷۲	۰٫۹۷
	۳۱۰	۱٫۰۱	۳٫۹۱	۰٫۹۲
BSA	۲۸۸	۱٫۵۰	۷٫۱۲	۰٫۹۸
	۲۹۸	۱٫۵۰	۷٫۰۲	۰٫۹۸
	۳۱۰	۱٫۴۸	۶٫۷۶	۰٫۹۹

با کمک داده‌های فلورسانس محاسـبه تغییـرات آنتـالپی، آنتروپی و انرژی آزاد گیبس در طی واکنش اطلاعات مفیدی را در ارتباط با وضعیت تعادلی در اختیار قرار می‌دهد. به طـور معمول ΔH^0 و ΔS^0 با شیب و عرض از مبدأ منحنـی وانـت – هوف تعیین می‌شود (جدول ۶).

جدول۶ مقادیر ترمودینامیکی به‌دست آمده برای برهم‌کنش HSA و BSA با BSATP-AgNPs در دماهای متفاوت

نمونه	T(K)	ΔG^0 (kJ mol^{-1})	ΔH^0 (kJ mol^{-1})	ΔS^0 (J mol^{-1})
HSA	۲۸۸	−۲۸٫۷۱	−۹۷٫۵۷ ± ۹٫۹۷	−۲۳۸٫۳۴ ± ۴٫۰۳
	۲۹۸	−۲۶٫۹۶		
	۳۱۰	−۲۳٫۴۷		
BSA	۲۸۸	−۳۹٫۴۳		
	۲۹۸	−۳۹٫۹۶	−۳۱٫۱۵ ± ۶٫۶۱	۲۹٫۰۷ ± ۱٫۴
	۳۱۰	−۴۰٫۰۸		

شیب مثبت نشان دهنده آن است که فرایند تشکیل کمپلکس در گستره دمایی مورد مطالعه گرمازا است. مقادیر محاسبه‌شده توابع ترمودینامیکی در جدول ۶ گزارش شده است. با توجه به اینکه برای HSA در این مطالعه $\Delta H^0 < 0$ و $\Delta S^0 < 0$ است، گمان می‌رود که برهم‌کنش اصلی بین HSA و BSATP-AgNPs پیوند هیدروژنی و نیروی ضعیف واتدروالس بوده است [۳۴].

برای BSA در این مطالعه $\Delta H^0 < 0$ و $\Delta S^0 > 0$ است. با توجه به قوانین خلاصه‌شده توسط رأس و سابرامنیام [۲۶]، ازآنجا که محلول آبی کمپلکسی از BSATP-AgNPs و BSA را شکل می‌دهد، مقدار مثبت ΔS^0 بیانگر آب‌گریزبودن برهم‌کنش این دو ترکیب است. زیرا مولکول‌های آب که در اطراف لیگاند و پروتئین منظم شده‌اند یک پیکربندی تصادفی را به‌دست آورده‌اند. از طرفی مقدار منفی ΔH^0 می‌تواند به‌طور پایه‌ای به پیوند هیدروژنی نسبت داده شود. بنابراین، برهم‌کنش‌های آب‌گریز و پیوندهای هیدروژنی در مراحل پیوند و مشارکت در پایداری کمپلکس BSATP-AgNPsو BSA نقش بزرگی را ایفا می‌کنند.

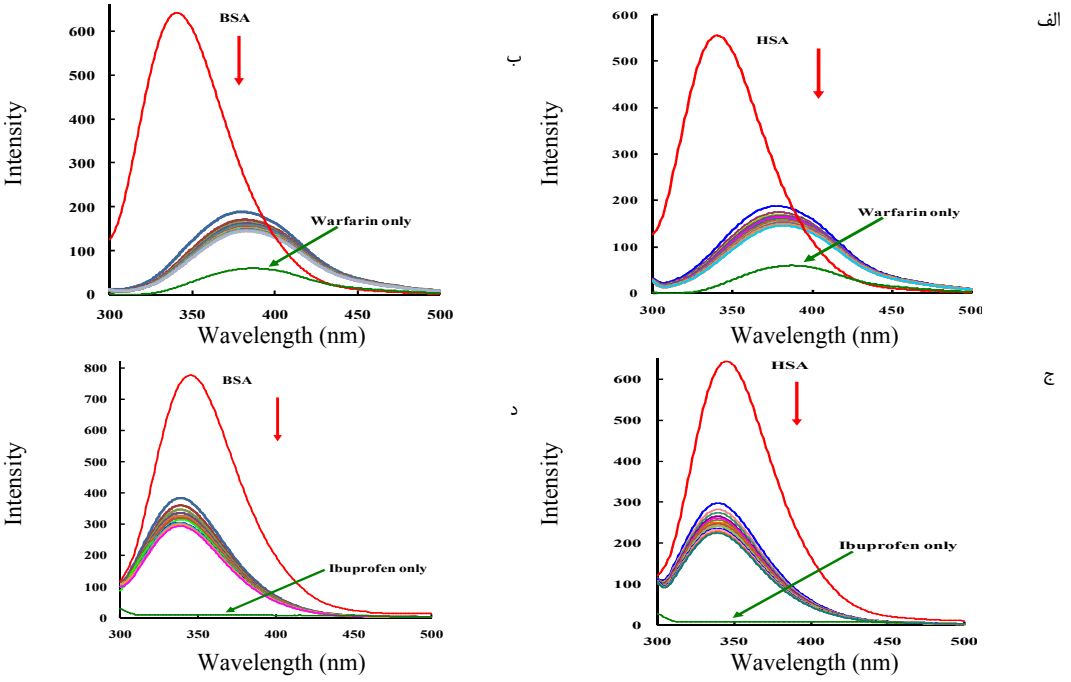
بررسی موقعیت پیوند نانوذره‌های BSATP-AgNPs با HSA و BSA با نشان‌دهنده‌های جایگاه

به منظور شناسایی جایگاه پیوند BSATP AgNPs بر HSA و BSA آزمایش‌های نشان‌دهنده جایگاه رقابتی انجام شده است. از وارفارین و ایبوپروفن که به‌طور ویژه به‌ترتیب در جایگاه‌های I و II در HSA و BSA متصل می‌شوند به عنوان نشان‌دهنده جایگاه استفاده می‌شوند [۳۴]. نشان‌دهنده‌های جایگاه پیوند I وارفارین، فنیل‌بوتازون و آزاپروپازون هستند. نشان‌دهنده‌های جایگاه II ایبوپروفن، فلوفنامیک اسید و کتوپروفن است. جایگزینی پروپ‌های ویژه HSA و BSA با BSATP AgNPs می‌تواند ویژگی و قدرت نسبی پیوند به دو جایگاه را مشخص سازد. وقتی دو لیگاند (پروپ و نانوذره‌های نقره BSATP-AgNPs) به HSA و BSA به‌طور همزمان متصل می‌شوند. دو نوع برهم‌کنش ممکن است رخ دهد [۴۰].

واکنش ۲ $\quad Probe \xrightarrow{+HSA} Probe\text{-}HSA \xrightarrow{+BSATP\text{-}AgNPs} BSATP\text{-}AgNPs\text{-}HAS + Probe$

واکنش ۳ $\quad Probe \xrightarrow{+HSA} Probe\text{-}HSA \xrightarrow{+BSATP\text{-}AgNPs} BSATP\text{-}AgNPs\text{-}Probe\text{-}HSA$

از خاموشی فلوئورسانس HSA و BSA پس از افزودن BSATP AgNPs به سامانه Probe و BSA (و یا HSA) بر BSATP-AgNPs، می‌توان جایگاه پیوند BSA– Probe وHSA – Probe را تعیین کرد. هنگامی‌که نانوذره‌های نقره در رقابت با نشان‌دهنده‌های جایگاه در پیوند به پروتئین هستند می‌تواند ثابت پیوند را تحت تأثیر قرار دهند. محلول BSATP AgNPs به داخل سیستم HSA و BSA و نشان‌دهنده جایگاه افزوده می‌شوند، سپس طیف فلوئورسانس مخلوط سه جزیی ((BSATP-AgNPs) –پروتئین – نشان‌دهنده جایگاه) در گستره ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر ثبت شد (شکل۸). بر پایه جدول ۷ ، تغییرات ثابت پیوند نانوذره به HSA در حضور وارفارین نسبت به ایبوپروفن بیشتر است که نشان می‌دهد نانوذره با جایگاه I و زیر گروه IIA پیوند برقرارکرده است. همچنین، تغییرات ثابت پیوند نانوذره به BSA در حضور ایبوپروفن بیشتر است. بنابراین، نانوذره‌های نقره عامل‌دارشده با جایگاه II و زیر گروه IIIA برهم‌کنش داشته است.



شکل ۸ اثر نشان‌دهنده‌های جایگاه (وارفارین و ایبوپروفن) بر خاموشی HSA (الف و ج) و BSA (ب و د) با نانوذره‌های BSATP-AgNPs در گستره غلظت پروفن و وارفارین برابر با ($۰/۰ - ۱ \times ۱۰^{-۵}$) مولار و غلظت سرم آلبومین انسانی و گاوی برابر با ۳×۱۰^{-۵} مولار است. طول موج تحریک ۲۹۰ نانومتر در دمای ۲۹۸ کلوین

جدول ۷ ثابت پیوند HSA و BSA در شرایط آزمایشگاهی مشابه به‌منظور مقایسه نشان‌دهنده‌های جایگاه (وارفارین و ایبوپروفن) در دمای ۲۹۸ کلوین و pH= ۷/۴

نمونه	نشان‌دهنده جایگاه	$\log K_f$	$K_f \times 10^6$ (M^{-1})	n	R^2
HSA	-	۵/۲۲	۵/۴۰	۰/۸۶	۰/۹۹
	ایبوپروفن	۳/۱۸	۳/۱۸	۱/۱۰	۰/۹۸
	وارفارین	۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۹۹	۰۹۷
BSA	-	۷/۱۲	۱۳/۲۹	۱/۶۲	۰/۹۸
	ایبوپروفن	۶/۹۵	۹/۰۰	۰/۸۳	۰/۹۸
	وارفارین	۷/۰۸	۱۲/۱۸	۱/۱۷	۰/۹۶

بررسی انتقال انرژی بین BSATP-AgNPs با HSA و BSA

انتقال انرژی رزونانسی فلورسانس FRET[1] یک فرایند انتقال انرژی از مولکول نشرکننده در یک حالت غیربرانگیخته به یک مولکول همسایه آن از راه برهم‌کنش دوقطبی- دوقطبی غیرتابشی است. رایج‌ترین کاربرد FRET محاسبه فاصله پیوند بین دو جایگاه در درشت‌مولکول‌ها و تخمین جهت‌گیری لیگاندهای نشرکننده و پذیرنده است. انتقال انرژی رزونانسی فلوئورسانس هنگامی روی می‌دهد که طیف فلورسانس نشرکننده (دهنده) با طیف جذبی دیگر مولکول (پذیرنده) همپوشانی کند. برپایه نظریه انتقال انرژی غیرتابشی فورستر بهره انتقال انرژی وابسته به گستره همپوشانی طیف نشری دهنده (HSA و BSA) با طیف جذبی پذیرنده (BSATP-AgNPs) ، جهت‌گیری نسبی دهنده و پذیرنده به صورت دو قطبی و فاصله بین دهنده و پذیرنده، کمتر از ۷ نانومتر است [۴۱]. انتقال انرژی مربوط به فاصله R_0 بین دهنده و پذیرنده با معادله ۹ به‌دست آمد.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{F}{F_0} \qquad (۹)$$

که در آن، r فاصله لیگاند تا باقی‌مانده تریپتوفان پروتئین، R_0 فاصله بحرانی (وقتی بهره انتقال ۵۰ ٪ باشد)، F_0 و F شدت فلورسانس در نبود و بودن غلظت ۱به ۱خاموش‌کننده است. R_0 از معادله ۱۰ به‌دست آمد. در این معادله K^2 عامل جهت‌گیری فضایی بین نشر دو قطبی‌دهنده و جذب دوقطبی از پذیرنده، N ضریب شکست محیط، φ بهره کوانتمی فلورسانس‌دهنده و J انتگرال همپوشانی طیف نشری دهنده و طیف جذبی پذیرنده است. J از معادله ۱۱ به‌دست آمد.

$$R_0^6 = 8.73 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \varphi J \qquad (۱۰)$$

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda)d\lambda} \qquad (۱۱)$$

در معادله ۱۱، F(λ) شدت فلوئورسانس تصحیح‌شده دهنده در گستره طول موج (λ تا λ+Δλ) و ε(λ) ضریب برانگیختگی مولار پذیرنده در طول موج(λ) است. در محاسبه بهره انتقال انرژی(E) نسبت غلظت مولار BSATP-AgNPs به آلبومین سرم ۱: ۱ است.

در این محاسبه‌ها K^2 برابر با ۲/۳، φ برابر با ۰/۱۵ (برای HSA) و ۰/۱۹ (برای BSA) و N برابر با ۰/۳۳۶ است که در این فاصله انتقال انرژی انجام می‌شود. مقدار r در $1/5\ R_0 < r < 0/5\ R_0$، مشخص‌کننده انتقال انرژی بین HSA و BSA با BSATP-AgNPs است [۴۱]. مطابق با محاسبه‌ها مقدار r کمتر از ۸ نانومتر بود که دلیل بر وجود سازوکار خاموشی استاتیک در خاموشی نشر BSATP-AgNPs با افزودن BSA و HSA است.

جدول ۸ عامل‌های انتقال انرژی برای پیوند نانوذره‌های BSATP-AgNPs با HAS و BSA

ترکیبات	r (nm)	R_0 (nm)	E × 10^3	J ($cm^6\ mmol^{-1}$) 10^{-14}
BSATP-AgNPs-HSA	۱/۶۴	۲/۷۹	۰/۹۸	۰/۰۴۷
BSATP-AgNPs-BSA	۳/۰۴	۴/۸۲	۴/۱۳	۰/۰۴۷

BSA و HSA با BSATP-AgNPs برهم‌کنش CD دورنگ‌نمایی دورانی مطالعه طیف

CD یک روش حساس برای مشاهده تغییر صورت‌بندی پروتئین درنتیجه بر هم‌کنش با مولکول کوچک است. HSA دو نوار ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر در طیف CD دارد. هردو پیک منفی ۲۰۸ نانومتر و ۲۲۲ نانومتر، ناشی از انتقال π به π*برای پیوندهای پپتیدی از مارپیچ ∝ هستند. با افزودن BSATP-AgNPs به محلول HSA و BSA شدت نوارهای طیف CD کاهش یافت (شکل ۹).

1. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

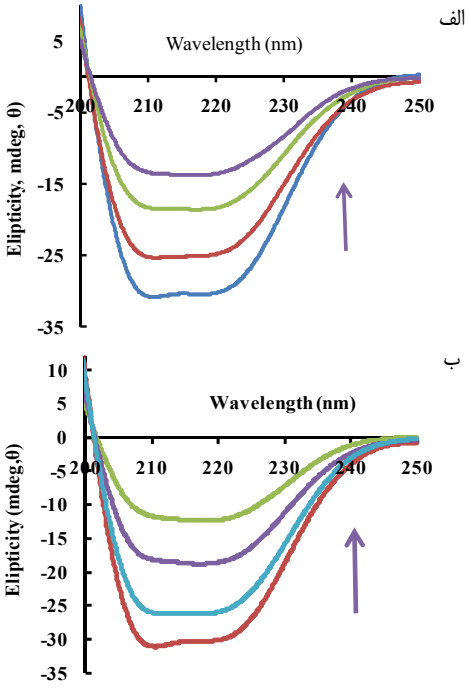
نتایج CD در عبارت میانگین بیضوی‌بودن[1] باقی‌مانده (MRE) در $deg\ cm^2\ dmol^{-1}$ برپایه معادله ۱۲ بیان می‌شود.

$$MRE = \theta_{Obs}/(10\ lnCp) \qquad (۱۲)$$

θ_{Obs} دورنگ‌نمایی دورانی مشاهده‌شده بر حسب میلی‌درجه، n تعداد باقیمانده‌های آمینو اسید (۵۸۵ برای HSA و ۵۸۳ برای BSA) طول مسیر سل یک سانتی‌متر و C_p غلظت مولار است. مقدار پیچش ∝ محاسبه‌شده بر پایه تغییر مقدار BSATP-AgNPs در ۲۰۸ نانومتر از معادله ۱۳ توسط گرینفیلد و فازمن تعیین شده است [۴۲].

$$-helix(\%) = \frac{-MRE_{208} - 4000}{33000 - 4000} \qquad (۱۳)$$

در این معادله MRE_{208} مقدار MRE مشاهده‌شده در ۲۰۸ نانومتر، ۴۰۰۰ مقدار MRE شکل- β و صورت‌بندی مارپیچ تصادفی عبورکرده در ۲۰۸ نانومتر و ۳۳۰۰۰ مقدار MRE از یک مارپیچ ∝ خالص در ۲۰۸ نانومتر است. نتایج نشان داد که سیگنال CD از HSA بدون جابه‌جایی در پیک برپایه افزایش غلظت BSATP AgNPs افزایش یافته است. افزایش سیگنال CD به سبب افزایش محتوی ساختار ثانویه مارپیچ آلفا است. مقدار مارپیچ آلفا در ساختار ثانویه HSA با معادله ۱۳محاسبه می‌شود. با افزایش غلظت BSATP-AgNPs مقدار مارپیچ آلفا محاسبه‌شده افزایش یافت (جدول ۹). این افزایش نشان می‌دهد که پیوند BSATP-AgNPs به HSA عامل ایجاد تغییر صورت‌بندی HSA بوده است.



شکل ۹ پیک‌های دورنگ‌نمایی دورانی محلول ۳×۱۰^{-۶} مولار از HSA (الف) و BSA (ب) در نبود و بودن BSATP-AgNPs ($۰/۰ - ۵/۴ \times ۱۰^{-۶}$ مولار در دمای ۲۹۸ کلوین و pH = ۷/۴

جدول ۹ تغییرهای درصد مارپیچ آلفا HSA و BSA در حضور مقادیر متفاوت نانوذره‌های نقره BSATP-AgNPs

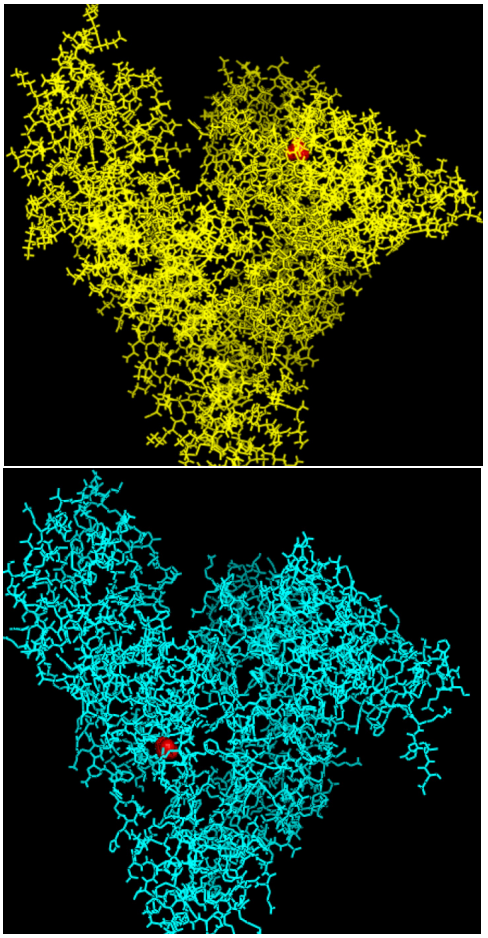
[BSA یا [HSA]/[BSATP-AgNPs]	∝ -helix (%)	
	BSA	HSA
۰/۰	۴۹/۳۰	۴۳/۷۶
۱/۰	۳۴/۴۷	۳۳/۵۸
۱/۴	۱۹/۷۸	۲۰/۸۵
۱/۸	۹/۸۶	۱۰/۹۸

مدل‌سازی مولکولی برهمکنش HSA و BSA با BSATP-AgNP

به منظور شفاف‌سازی برهم‌کنش 4-BSATP-AgNPsبا HSA و BSA مطالعه مدل‌سازی مولکولی انجام

1. Ellipticity

شد. هدف این ترویج فهم بصری از جایگاه پیوند در سطح مولکولی بود. مطابق با مدل‌سازی مولکولی انجام‌شده، پایدارترین صورت‌بندی با کمترین انرژی پیوند برای مشخص‌کردن جایگاه پیوند BSATP-AgNPs به HSA و BSA به‌کاررفت. همان‌طور که مشاهده می‌شود BSATP-AgNPs در HSA در مکان I زیر گروه IIA و در BSA در مکان II شکل قرار گرفته است (شکل ۱۰).



شکل ۱۰ صورت‌بندی به‌دست آمده برای برهم‌کنش بین HSA (الف) و BSA (ب) با BSATP Ag NPs از بهینه‌سازی با مدل‌سازی مولکولی داکینگ است. جایگاه پیوند مشخص‌شده مربوط به BSATP-AgNPs به رنگ قرمز نشان داده شده است.

نتیجه‌گیری

مولکول BSATP-AgNPs برهم‌کنشی با DNA برقرار می‌کند که با روش‌های متفاوت سازوکار این برهم‌کنش بررسی و مشخص شد که یک برهم‌کنش الکترواستاتیک در شیارهای کوچک DNA است. پیک جذبی BSATP-AgNPs در اثر برهم‌کنش با DNA جابه‌جایی کمتر از ۷ نانومتر دارد که دلیل بر پیوند شیاری است. تغییرهای بسیار اندک در مقدار گران‌روی نشان می‌دهد که BSATP-AgNPs پیوند در بخش شیاری DNA برقرارکرده است. نتایج CD نشان داد که با افزایش BSATP-AgNPs تغییرهای صورت‌بندی در مارپیچ DNA رخ می‌دهد. شدت نوار منفی افزایش و نوار مثبت کاهش یافت که نشان‌دهنده پیوند شیاری است. نتایج محاسبه‌های کامپیوتری داکینگ نشان داد که BSATP-AgNPs در محل شیارهای کوچک با DNA پیوند دارد. مطالعه اثر قدرت یونی، یک کاهش در شدت پیک جذبی فرابنفش–مرئی محلول BSATP-AgNPs و DNA را نشان داد که تاییدکننده نوع پیوند الکترواستاتیک است. در محاسبه ثابت پیوند BSATP-AgNPs با DNA به روش طیف‌سنجی جذبی، مقدار K_b به‌دست آمده (M^{-1} ۱۰۵ × ۱/۴۴) با مقادیر گزارش‌شده پیونددهنده‌های الکترواستاتیک و شیاری همخوانی دارد. مقادیر به‌دست آمده آنتالپی ($\Delta H^0 < 0$) و آنتروپی ($\Delta S^0 > 0$) تایید کرد که نیروی اصلی پیوند BSATP-AgNPs با DNA نیروی الکترواستاتیک است.

با روش‌های متفاوت مشخص شد که BSATP-AgNPs در HSA در مکان I زیر گروه IIA و در BSA در مکان II پیوند برقرارکرده است. کاهش شدت پیک جذبی فرابنفش–مرئی در حضور مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs نیز نشان‌دهنده وجود برهم‌کنش بین BSATP-AgNPs با BSA و HSA است. بررسی خاموشی فلورسانس HSA و BSA با افزودن BSATP-AgNPs نشان‌داد که هردو سازوکار خاموشی

استاتیک و دینامیک در خاموشی فلورسانس تاثیرگذار بودند. ثابت پیوند محاسبه‌شده از روش فلوئورسانس برای HSA و BSA به‌ترتیب M^{-1} ۱۰^{۵} × ۱٫۷ و M^{-1} ۱۰^{۷} × ۱٫۶ بود. عامل‌های ترمودینامیکی مشخص کرد که برهم‌کنش اصلی بین HSA و BSATP-AgNPs پیوند هیدروژنی و نیروی ضعیف واندروالس بوده است و در پایداری کمپلکس BSATP-AgNPs و BSA برهم‌کنش‌های آب‌گریز و پیوندهای هیدروژنی در مراحل پیوند و مشارکت نقش بزرگی را ایفا می‌کنند. در مطالعه‌های انتقال اترژی فلوئورسانس، فاصله پیوند ۲٫۷۹ نانومتر برای HSA و فاصله ۴٫۸۲ نانومتر برای BSA از راه محاسبه به‌دست آمد. مطالعه طیف‌های CD مربوط به HSA و BSA نشان داد که با افزودن مقادیر متفاوت BSATP-AgNPs شدت پیک‌ها در طیف و درصد مارپیچ ∝ محاسبه شده افزایش می‌یابد که دلیلی بر تغییر صورت‌بندی HSA و BSA در اثر برهم‌کنش است. مدل‌سازی مولکولی نیز موید پیوند BSATP-Ag NPs به HSAدر مکان I زیر گروه IIA و پیوند به BSA در مکان II است.

مراجع

[1] Opar, A; Nat. Rev. Drug Discov. 8(6), 437-8, 2009.

[2] Yezhelyev, M.V; Gao, X.; Xing, Y.; Al-Hajj, A.; Nie, S.; O'Regan, R.M.; Lancet Oncol. 7, 657-667, 2006.

[3] Choi, Y.H; Han, H.K.; J. Pharm. Investig. 48, 43–60, 2018.

[4] CHAN, H.K.; Adv. Drug Deliver. Rev. 63(6), 405-40, 2011.

[5] Russell, A.D.; Hugo, W.B.; "7 Antimicrobial activity and action of silver", Progress in Medicinal Chemistry, Elsevier, UK, 1994.

[6] Lee, S.H.; Jun, B.H.; Int. J. Mol. Sci. 20, 865-889, 2019,

[7] Chugh, H.; Sood, D.; Chandra, I.; Tomar, V.; Dhawan, Chandra, G.; Artif. Cells Nanomed. Biotechnol, 46, 1210-1220, 2018.

[8] Ravindran, A.; Chandran, P.; Khan, S.S.; Colloids Surf. B 105, 342–352, 2013.

[9] Basu, S.; Jana, S.; Pande, S.; Pal, T.; J. Colloid Interface Sci. 321, 288–293, 2008.

[10] Zheng, J.; Wu, X.; Wang, M.; Ran, D.; Xu, W.; Yang, J.; Talanta 74, 526–532, 2008.

[11] Rutkauskas, K.; Zubrienė, A.; Tumosienė, I.; Kantminienė, K.; Kažemėkaitė, M.; Smirnov, A.; Kazokaite, J.; Mourkunaite, V.; Capkauskaite, E.; Manakova, E.; Grazulis, S.; Zigmuntas, J.B.; Matulis, D.; Anhydrases Molecules 19, 17356-17380, 2014.

[12] Kalgutkar, A.S; JONES, R.M.; Sawant, A; "Sulfonamide as an essential functional group in drug design (Chap. 5)" in "Metabolism, Pharmacokinetics and Toxicity of Functional Groups: Impact of Chemical Building Blocks on ADMET, Edited by Dennis, A.S.", Royal Society of Chemistry, UK, 2010.

[13] Kordestani, D.; Ph.D Thesis, Razi University, Kermanshah, Iran, 2013.

[14] Akdi, K.; Vilaplana, R.A.; Kamah, S.; González-Vílchez, F.; J. Inorg. Biochem. 99(6), 1360-1368, 2005.

[15] Amendola, V.; Bakr, O.M.; Stellacci, F.; Plasmonics 5(1), 85–97, 2010.

[16] Asker, F.W; Mahamad, Z.Z.; Eliwei, A.G.; Nief, O.A; Int. J Appl. Chem. 13(2), 169-177, 2017.

[17] Başar, E; Tunca, E; Bülbül, M; Kaya, M; J Enzyme Inhib. Med. Chem. 31(6), 1356–1361, 2016.

[18] Liu, Z.C.; Wang, B.D.; Yang, Z.Y.; Li, Y.; Qin, D.D.; Li, T.R.; Europ J Med. Chem. 44, 4477-4484, 2009.

[19] Shahabadi, N.; Amiri, S.; Zhaleh, H.; J Coord. Chem. 73, 1-17, 2020.

[20] Shi, S.; Liu, J.; Li, J.; Zheng, K.C.; Huang, X.M.; Tan, C.P.; Chen, L.M.; Ji, L.N.; J. Inorg. Biochem. 100, 385-395, 2006.
[21] Kumar, K.A.; Reddy, K.L.; Satyanaryana, S.; Transit. Metal Chem. 35, 713-720, 2010.
[22] Wolfe, A.R.; Meehan, T.; Nucleic Acids Res. 22, 3147-3150, 1994.
[23] Jalali, F.; Dorraji, P.; J. Pharm. Biomed. Anal. 70, 598-601, 2012.
[24] Kashanian, S.; Zeidali, S.H.; DNA Cell Biol. 30, 499-505, 2011.
[25] Lakowicz, J.R.; "Principles of fluorescence spectroscopy 2nd Ed.", Springer, USA, 2013.
[26] Ross, P.D.; Subramanian, S.; Biochemistry 20, 3096-3102, 1981.
[27] Sahabadi, N.; Maghsudi, M.; Dyes and Pigm. 96(2), 377-382, 2013.
[28] Patra, A.K.; Nethaji, M.; Chakravarty, A.R.; J. Inorg. Biochem. 2007, 101(2), 233-244.
[29] Ahmadi, F.; Alizadeh, A.A.; Bakhshandeh, F.; Jafari, B.; Khodadadian, M.; Food Chem. Toxicol. 48(1), 29-36, 2010.
[30] Yang, H.; Xing-Ming W.; J. Mol. Struct. 1036, 51-55, 2013.
[31] Freifelder, D.M.; "Physical biochemistry: Applications to biochemistry and molecular biology", 2nd Edition, Amazon Book, USA, 1982.
[32] Silverman, R.B.; Holiaday, M.W.; The organic chemistry of drug design and drug action. Academic press, 2014.
[33] Neidle, S. Nat. Prod. Rep. 18(3), 291-309, 2001.
[34] Shahabadi, N.; Hadidi, S.; Feizi, F.; Spectrochimica Acta A 138, 169–175, 2015.
[35] Abou-Zied, O.K; Al-Shishi, O.I.K; J. Am. Chem. Soc. 130 (32), 10793-10801, 2008.
[36] Permyakov, E.A.; Luminescent spectroscopy of proteins, CRC Press, USA, 1992.
[37] Keizer, J.; J. Am. Chem. Soc. 105, 1494-1498, 1983.
[38] Eftink, M.R.; Ghiron, C.A.; Biochemistry 16(25), 5546-5551, 1977.
[39] Boaz, H.; Rollefson, G.K.; J. Am. Chem. Soc. 72(8), 3435-3443, 1950.
[40] Dufour, C.; Dangles, O.; Biochim. Biophys. Acta (BBA), 1721(1), 164-173, 2005.
[41] Förster, T.; J. Biomed. Optics 17(1), 0110021-01100210, 2012.
[42] Greefield, N.J.; Fasman, G.D.; Biochemistry 8(10), 4108- 4116, 1969.

JARC

Preparation and identification of 4- benzenesulfonamidethiophenol grafted on silver nanoparticles and binding studies with calf thymus DNA, human serum albumin and bovin serum albumin using spectroscopic and molecular docking methods

Fereshteh Amiri[1], Marzieh Sadeghi[2,*], Tahereh Shokri[3]

1. M.Sc. of Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Payam Noor University, Khoy, Iran.
2. Assistant Prof. of Analytical Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Razi University, Kermanshah, Iran.
3. M.Sc. Student of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Razi University, Kermanshah, Iran.

Abstract: In this article, silver nanoparticles capped with 4-benzenesulfonamideaminothiophenol (BSATP-AgNP) were synthesized. The formation of synthesized nanoparticles was characterized by UV–Vis spectroscopy, FTIR, TEM, and NMR. The interactions between the silver nanoparticles with calf-thymus DNA, human serum albumin (HAS) and bovine serum albumin (BSA) were investigated by UV-Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, circular dicroism (CD) spectroscopy, viscosity measurements, and molecular docking studies. Circular dicroism data showed that binding of BSATP-AgNPs to DNA resulted in changes in the structure and conformation of DNA. This indicates a minor groove mode of binding. Fluorimeteric studies showed a decrease in fluorescence intensity of the BSATP-AgNPs in the presence of increasing amounts of DNA solution. The results of CD data indicate that the conformation of HSA and BSA molecules is changed significantly in the presence of BSATP-AgNPs. The negative ΔH and ΔS values indicate that the main interactions between BSATP-AgNPs and HSA were hydrogen bonding and weak van der Waals forces. The results of the site marker competitive experiment confirmed that the BSATP AgNPs can bind to HSA located within site I (subdomain IIA) and BSA within site II. The experimental results were in agreement with the results obtained via a molecular docking study. This study provided important insight into the interaction of BSATP-AgNPs with DNA and serum albumin, facilitating further investigation on the pharmacological behavior of BSATP-AgNPs.

Keywords: BSATP functionalized silver nanparticles, DNA, Human serum albumin, Bovine serum albumin, Spectrocopic studies, Molecular ducking

*** Corresponding author Email:** m.sadeghi@razi.ac.ir